

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Autofagia selectiva en la retina: Fisiología y patología**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Beatriz Villarejo Zori**

Directora

**Patricia Boya Tremoleda**

**Madrid**





UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



UNIVERSIDAD

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
Centro de Investigaciones Biológicas



## Autofagia selectiva en la retina: Fisiología y patología

Memoria presentada por Beatriz Villarejo Zori para optar al grado de Doctora en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina por la Universidad Complutense de Madrid

VºBº de la Directora de la Tesis

VºBº de la tutora

Patricia Boya Tremoleda

Cristina Blázquez Ortiz

Beatriz Villarejo Zori

2019







U N I V E R S I D A D  
**COMPLUTENSE**  
M A D R I D

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS  
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. Beatriz Villarejo Zori \_\_\_\_\_,  
estudiante en el Programa de Doctorado Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina \_\_\_\_\_,  
de la Facultad de Ciencias Químicas \_\_\_\_\_ de la Universidad Complutense de  
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y  
titulada:

Autofagia selectiva en la retina: Fisiología y patología.

y dirigida por: Patricia Boya

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 22 de agosto de 2019

Beatriz  
Villarejo  
Zori  
Fdo.: \_\_\_\_\_

Firmado  
digitalmente por  
Beatriz Villarejo Zori  
Fecha: 2019.08.22  
17:15:13 +02'00'



*“Donde no hay lucha, no hay fuerza”*

*Oprah Winfrey*

A mis padres, Upe y Diógenes.



## Agradecimientos

Quizá esta parte sea la que más me cueste redactar y en la que más me alargaría. Esta tesis no hubiera podido ser tesis sin el apoyo y la compañía de los que van a ser nombrados a continuación. A cada uno de ellos les corresponde un pedazo de este libro y es por ello que os debo tanto de toda esta etapa “predoctoral”.

En primer lugar, quiero agradecer el haber podido llegar hasta aquí y haber logrado esta tesis a la doctora Patricia Boya. Gracias lo primero por confiar en mí, por darme la oportunidad de crecer tanto científica como personalmente, por tus buenas palabras, por tus ánimos, por hacerme ver que era capaz de conseguirlo, por enseñarme, por guiarme en este mundo científico y por tanto apoyo dado. Gracias por ser como mi mamá y decirme la frase “esto es lo que tiene hacerse mayor”. Si tuviera que elegir de nuevo un laboratorio para realizar la tesis no tendría ninguna duda en volver a elegirlo. Gracias por estos años compartidos, ha sido un placer aprender de ti.

Al doctor Ian Ganley, por acogerme en su laboratorio durante la estancia. Muchas gracias por enseñarme tanto y por haber aportado tanto a esta tesis. Fue un placer y una gran experiencia haber trabajado allí.

Gracias Cristina, por haber tutorizado esta tesis y haberme ayudado siempre. Y gracias a la Fundación Tatiana Pérez de guzmán el Bueno, por haber financiado esta tesis.

También quiero agradecer a los doctores Catalina Hernández, Flora de Pablo, Enrique de la Rosa el haberme enseñado en mis primeros pasos científicos, sin aun haber terminado incluso la carrera. A la doctora Teresa Suárez, gracias por acogerme tan bien desde el primer momento.

A mis compañeros de laboratorio, sin lugar a dudas, gracias por aguantarme y por tanto apoyo dado, no hubiera sido capaz sin vosotros. A Elena, que te voy a decir, esta tesis está compartida contigo tanto científica como emocionalmente. Gracias por todos los experimentos aportados, de verdad que sí, has hecho un trabajo extraordinario, pero sobre todo, gracias por tanto apoyo moral. Por ser mi compi de espalda y por aportarme tanto cada día, si no te hubiera tenido todo hubiera sido mucho más complicado, y lo sabes. Gracias por las conversaciones, por los regalos inesperados, por preocuparte por mí, por tus ánimos y tus mensajes, por tantas risas compartidas, por salvarme tantas veces y por tranquilizarme en los peores momentos, gracias por cuidarme. Eres genial, de verdad. Has sido uno de los grandes descubrimientos de mi tesis. A Raquel, gracias por transmitirme paz y tranquilidad, por el buen rollo, por escucharme, por tanto tiempo compartido, por apoyarme siempre, por ofrecerme siempre tu ayuda, por acogernos en NY y ser la mejor guía turística, aunque nos cargamos el tostador y por la lucha de sumos. Te echo de menos al otro lado de la pared. A Natalia, gracias por tanta sabiduría, por las tardes compartidas, por el “no te quedes hasta muy tarde”, los alemanes van a flipar contigo. A Iñahui, gracias por siempre ayudar, por haberme aceptado aun conociéndome en la peor etapa de la tesis, por tu buen

humor y por tus ganas de aprender. A Patricia, Inés R, Petra, Inés M y Katherina gracias por el día a día y por vuestro apoyo.

A los que estuvieron en el labo. Nacho, a ti te reservo para después. Ana, amiga, gracias por compartir la vida conmigo. Por ser uno de mis pilares, por tanto vivido, por los viajes, los festivales, por darme otra visión de la vida, por hacerme valorarme, por las conversaciones tan profundas, por entenderme tanto, las ganas de dar patás, por tu confianza, por haberme apoyado siempre, por siempre estar, aun en la distancia te siento cerca. A Esther, gracias por enseñarme tan bien en mis primeros pasos en el labo, aprendí mucho de ti y de la mejor forma. Por tu paciencia, por tu serenidad y por dejar tanta huella, aun te echamos de menos. A Lorena, gracias por los selfies compartidos y por las fiestas del CIB.

A Alberto, Jose, Noe, Miguel Marchena, y Chus, gracias equipo, por enseñarme tantísimo cuando aun era una niña. Por vuestra paciencia conmigo, por cuidarme tanto, por los momentos buenos y por los difíciles también. A Patri L, chiqui, te nos has ido lejos, pero te dejas caer por aquí y eso me alegra. Gracias por los momentos compartidos dentro y fuera del labo. A Patri V., gracias, de verdad, por tanto dado. Por nuestra forma de pensar todas las tardes, por las palmas, las galletas, el viaje a Valencia y por demostrarme que valía para esto. A Marisa, te echo de menos, tantas y tantas conversaciones y tantas comidas compartidas, gracias por haberme aportado tanto siempre. A María Platón, compi, gracias por tantas risas y por haber sido siempre de gran ayuda, por tantas cosas compartida. A Tani, Alonso, María Donina, gracias por el día a día. A Mariano, gracias por tu buena voluntad y por tu buen humor, lo contagias!.

Gracias también a mi grupo-CIB. Natalia, viva Asturias y viva el queso, gracias por tanto compartido, por robar mantas, por reír tanto, por nuestras tonterías, por las confidencias, por tu ánimo continuo y por siempre estar. Echo de menos tenerte cerquita. A Álvaro, fíjate, que viniste para un mes al labo y te has quedado en mi vida. Gracias por tu risa contagiosa, por tantas y tantas meriendas, por los buenos momentos dentro y fuera del CIB y sobre todo, por lo que pasó en el “vacaciones”, ya tú sabes. A Arturo, gracias por tantas conversaciones, por todo lo vivido y por escucharme siempre. A Mario, gracias por siempre transmitir alegría, por tu buen rollo, por acogernos en Zamora y por siempre escuchar mis audios tan rápido, guiño, guiño. A Pablo, te meto aquí porque de eres de aquí, gracias por tus ganas y por tu buena voluntad. A Ignacio, gracias por todo lo que me llevo de ti, por haber sido mi compañero de tesis y amigo, hemos vivido mucho.

Gracias a los servicios del CIB, sois indispensables. a la gente del animalario, especialmente a Carlos, Dani, Tomás, Manolo y Angélica. A Maite y Gema de microcopía confocal. A Fernando y Begoña de microscopía electrónica.

Gracias a los del labo de Dundee, en especial a Lambert, Francois, Fong y y Alice, parte de esta tesis también os corresponde. Gracias por toda vuestra ayuda, por acogirme como una más, por enseñarme tanto y por trabajar tan bien. Sois unos cracks.

Y como no, a vosotros, a los que os debo parte de mi vida, amigos. Especialmente, tengo que hacer mención a unas personitas que me han aguantado especialmente y que han hecho que esta tesis salga adelante:

A ti, Inma, por siempre ser mi alma gemela. Por ponerte siempre en mi lugar y haberme sabido tranquilizar en los peores momentos. Aportándome siempre soluciones, calma, sabiendo que decir y cómo actuar en cada momento porque me conoces mejor que yo misma. Desde el momento que venías a mi casa a buscarme para ir al cole, hasta el momento que venías a mi casa para comer conmigo mientras que descansaba de escribir la tesis, gracias, por no dejar de creer en mí nunca. Gracias por quererme de una forma tan sincera. Como tú siempre me dices, eres la mejor.

Elena, aquella persona que conocí en el baño de la facultad y en el tren en un mismo día. Gracias por estar siempre pendiente, por regañarme cuando he desaparecido porque estaba agobiada, por hacerme ver la realidad y decirme “Yo te entiendo Bea, pero el mundo no es como tú, ojalá hubiera más personas como tú en el mundo porque todo sería más fácil, pero la realidad es que no es así”. Por mostrarme que es distanciarse de una amistad fuerte. Y gracias también por aguantarme estos últimos meses que no han sido nada fáciles, por con solo un mensaje llamarme o presentarte en mi casa, es una fortuna tenerte. Lucía, mi persona B. Eres una persona muy especial para mí. Sabes que hay cosas que solo entendemos las personas B y que por muchas hostias que nos llevemos de la B no nos sacan y seguimos ahí, haciéndonos nuestro huequito. Por tu paciencia conmigo cuando he perdido los papeles a lo largo de esta tesis. Por repetirme una y otra vez lo especial, valiente, fuerte y única que soy, y que esto era otra cosa más que iba a conseguir. A Lau, eres increíble. Gracias por todo lo que me has dado siempre, por siempre confiar en mí, por siempre estar a mi lado, por estos meses haberme ayudado tanto, lo he valorado muchísimo. Por los años de carrera, los trabajos y el herbario. La sorda y el cojo. Por ser tú, y ser la mejor atlética que existe. Por los viajes y todo lo vivido. Aquí estaré siempre. A Sus, por siempre tu sonrisa, tu apoyo constante, por ser mi compi de sofá cama, sin datos y sin maletas. Por tener un hueco siempre para ayudar aunque no estés pasando por el mejor momento. Eres muy fuerte. Gracias por tanto. A Martina, gracias por ser tan mágica. Por tu cariño y tus buenas palabras, por ser tan parecida a mí, y por comprenderme. Por todo lo que hemos compartido, tanto vivido, como mental. Te admiro, ya lo sabes.

A las de Aranjuez, Andrea, Miriam y Carmen. Gracias por desde pequeñas seguir a mi lado. No hay mejor familia para elegir. A Cris, gracias por ser mi primera amiga de la universidad, por todo lo que nos unió y nos sigue uniendo, por acogirme tantas veces en casa y por tanto vivido. A Diego, gracias por ser mi compi de películas infantiles, por haberme apoyado tanto y por invitarme a ver al atleti siempre que te sobra un carné. A las de la uni, Victoria, Pau y Aída, gracias por tanto compartido, por los viajes, por las fiestas y por ser vosotras. A los de Francia, Olga, Ernesto, Germán, Rubio, Emilio. Gracias por ese pedazo de viaje, y gracias por ser tan increíbles. Habéis



sido un descubrimiento para mí. Olga, compañera, gracias por tu fe ciega en mí, por ser la mejor lanzadora de objetos, por apoyar mis locuras o iniciarlas y por ser tan especial para mí incluso estando lejos.

Gracias a mi hermano, mi cuñada y sobrina, que os voy a decir, sois parte muy importante en mi vida, gracias por siempre confiar en mí y saber que llegaría hasta aquí. Por vuestro apoyo. Leticia, gracias por ser la alegría de mi vida. Gracias a toda mi familia, tios/as y primos/as y a mi familia política. Gracias por siempre empujarme hacia delante.

A mis padres. Supongo que para vosotros las palabras se me hacen más complicadas. Es un camino de 26 años dándolo todo por mí, sin fallar ni una sola vez. Dicen que la familia no se elige, pero es que si se eligiera, os elegiría una y mil veces. A vosotros, os tengo que agradecer tantas cosas que escribiría otra tesis solamente para ello. Si estoy aquí, os aseguro que es por todo vuestro esfuerzo. Por desde pequeña darme todo el cariño y amor del mundo. Por confiar en mí, por escucharme y hablarme tanto y seguir haciéndolo a día de hoy. Siempre he sido una niña muy agobios y muy estresada en cuanto a estudios y trabajo se refiere, que os voy a contar, pero os habéis ganado el cielo aguantándome y haciéndome ver, que una vez más, sería capaz. Gracias por darme la oportunidad de llegar donde estoy, sin vuestro empeño y esfuerzo, que ha sido mucho porque la vida no siempre nos ha sonreído, no hubiese sido posible. Gracias por nunca dejarme caer y por vuestra empatía, por ver mis problemas, problemas reales y escucharme y estar a mi lado durante el tiempo que hiciera falta. Gracias por ser tan especiales.

A Nacho, que te voy a decir a ti, que no se si te darán el Nobel de medicina, pero desde luego el Nobel de la paciencia te lo has ganado. Gracias por solo tú, saber como me has aguantado, apoyado y tranquilizado estos meses de escritura, te debo mucho, y sabes que no hubiera sido posible sin ti. Ojalá cuando te llegue a ti sepa estar a tu lado de la misma forma que lo has hecho tú. Y sobre todo, gracias por ser mi compañero de vida. Gracias por ser tú esa persona especial que te hace sentir que la vida merece la pena. Gracias por toda la confianza, por dar sin esperar nada, por tu sinceridad, por tu tranquilidad, por conocerme tan bien, por ser mi debilidad más absoluta y por hacerme feliz. Gracias por haber aparecido en mi vida y que nos hayamos elegido, porque, como siempre te digo, no hay mayor fortuna que tenerte. Seguiremos pudiendo juntos, con todo, como siempre. Gracias por tú.

Y gracias abuela, me hubiera hecho mucha ilusión que hubieras llegado al día de la lectura de mi tesis, y por poco lo conseguimos. Gracias por tanta enseñanza y tanto cariño siempre, se que ahora me cuidas desde allí arriba, y yo, desde aquí abajo, te dedico todo el esfuerzo puesto en esta tesis, se que estarás orgullosa de mí.





<b>Resumen .....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>3</b>
<b>Abreviaturas .....</b>	<b>5</b>
<b>1 Introducción .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 La autofagia: Características generales .....</b>	<b>11</b>
1.1.1 Macroautofagia .....	12
1.1.1.1 Fases de la autofagia: Formación de autofagosoma .....	13
1.1.1.2 Receptores y adaptadores de la autofagia .....	14
1.1.1.3 Regulación de la autofagia .....	15
1.1.1.4 Flujo de autofagia .....	15
1.1.1.5 Autofagia selectiva .....	16
1.1.2 Autofagia en la fisiología y la patología .....	17
1.1.2.1 Funciones fisiológicas de la autofagia: desde el desarrollo hasta el envejecimiento .....	18
1.1.2.2 Funciones patológicas de la autofagia: desde el cáncer, la inmunidad hasta las enfermedades neurodegenerativas. ....	20
<b>1.2 Autofagia selectiva: Mitofagia .....</b>	<b>21</b>
1.2.1 Mitocondria .....	21
1.2.2 La Mitofagia .....	23
1.2.2.1 Funciones de la mitofagia. ....	23
1.2.2.2 Reguladores de la mitofagia. ....	24
1.2.2.3 Vía de degradación de las mitocondrias por PINK1/Parkin. ....	25
1.2.2.4 Vía de degradación de las mitocondrias por NIX/BNIP3.....	27
1.2.2.5 Mecanismos de compensación entre las vías de mitofagia.....	28
1.2.2.6 Papel de la mitofagia en la fisiología y la patología. ....	29
1.2.2.7 Estrés oxidativo y mitofagia. ....	30
1.2.2.8 Técnicas para el estudio de mitofagia en los tejidos .....	31
<b>1.3 Autofagia no canónica.....</b>	<b>32</b>
1.3.1 Mecanismos de autofagia no canónica .....	32
1.3.1.1 Fagocitosis asociada a LC3 (LAP).....	33
<b>1.4 La retina de vertebrados .....</b>	<b>38</b>
1.4.1 La retina en desarrollo .....	38
1.4.1.1 Desarrollo de la retina neural de ratón.....	38
1.4.1.2 Muerte celular en el desarrollo embrionario .....	39
1.4.1.3 Papel de la microglía en el desarrollo embrionario .....	40
1.4.2 La retina adulta .....	41
1.4.2.1 Estructura y función de la retina adulta.....	41
1.4.2.2 Degeneración de fotorreceptores y tipos de muerte. ....	43
1.4.2.3 Distrofias retinianas: Retinosis Pigmentaria (RP) y modelos. ....	44
1.4.2.4 Mitocondrias y mitofagia en fotorreceptores .....	46
<b>2 Objetivos.....</b>	<b>49</b>

### **3 Materiales y métodos ..... 53**

#### **3.1 Procedimientos con animales .....55**

3.1.1	Ética y mantenimiento y procesamiento de los animales .....	55
3.1.2	Modelos animales .....	55
3.1.2.1	Ratones C57BL/6J y CD1 .....	55
3.1.2.2	Ratones knockout de Atg5 .....	55
3.1.2.3	Ratones transgénicos mCherry-GFP-FIS1101-152 (Mito-QC) .....	56
3.1.2.4	Ratones transgénicos mCherry-GFP-MAP1LC3B .....	56
3.1.2.5	Ratones deficientes del dominio WD de Atg16L1 (LAP-/-) .....	56
3.1.3	Genotipaje de animales .....	57
3.1.3.1	Extracción de DNA de las colas de embrionario y adulto .....	57
3.1.3.2	Genotipaje de ratones y embriones de la colonia Atg5 .....	58
3.1.3.3	Genotipaje de ratones de la colonia Mito-QC .....	59
3.1.4	Inyecciones intraperitoneales de diferentes fármacos .....	60
3.1.4.1	Inyección intraperitoneal y preparación de N-Methyl-N-nitrosourea (MNU) .....	60
3.1.4.2	Inyección intraperitoneal y preparación de leupeptina (estudio de flujo de autofagia <i>in vivo</i> ) .....	60
3.1.5	Procesamiento de muestras .....	61
3.1.5.1	Extracción del globo ocular .....	61
3.1.5.2	Disección de la neuroretina de animales adultos .....	61
3.1.5.3	Cultivo de neuroretinas de ratón adulto .....	62
3.1.5.4	Crio secciones de ojo de ratón adulto .....	63
3.1.5.5	Disección de la neuroretina embrionaria .....	63
3.1.5.6	Cultivo de neuroretinas de embriones de ratón .....	64
3.1.5.7	Montaje en plano de retinas embrionarias en membrana de nitrocelulosa .....	65
3.1.6	Técnicas de biología celular y molecular en tejido .....	65
3.1.6.1	Medida de muerte celular por reacción de TUNEL .....	65
3.1.6.2	Inmunofluorescencia de retinas embrionarias en plano y marcaje con Lectina de Tomate (TL) .....	68
3.1.6.3	Inmunofluorescencia de retinas adultas en plano .....	68
3.1.6.4	Inmunofluorescencia en crio secciones de retinas adultas .....	69
	.....	70
3.1.6.5	Determinación de los niveles de masa mitocondrial por citometría de flujo en retinas de animales adultos .....	71
3.1.7	Técnicas bioquímicas .....	71
3.1.7.1	Medida de los niveles de ATP en retinas embrionarias .....	71

#### **3.2 Cultivos de líneas celulares .....72**

3.2.1	Líneas celulares .....	72
3.2.1.1	Generación de la línea ARPE-19 Mito-QC Parkin sobreexpresada: Transfección Retroviral ..	73
	.....	73
3.2.2	Inmunofluorescencia en células y marcaje de DAPI .....	74
3.2.2.1	Plaqueo de células sobre cubreobjetos celulares .....	74
3.2.2.2	Marcaje de DAPI en líneas celulares Mito-QC .....	75
3.2.2.3	Inmunofluorescencia en cristales de líneas celulares .....	76
3.2.2.4	Tinción de compartimentos ácidos: LysoTracker .....	77
3.2.3	Medida de viabilidad celular mediante Cristal Violeta .....	77
3.2.4	Western Blot en células .....	77

3.2.4.1	Extracción y detección de proteínas en células SH-SY-5Y .....	77
3.2.4.2	Inmunodetección de proteínas en membrana de células SH-SY5Y: Western blot .....	78
3.2.4.3	Extracción de proteínas de células ARPE-19 .....	79
3.2.4.4	Detección de proteínas en membrana de células ARPE-19 .....	79
3.2.5	Medida de los niveles de mitofagia en células: Citometría de Flujo .....	80
3.2.6	Microscopía electrónica de transmisión .....	80
<b>3.3</b>	<b>Adquisición de imágenes con fluorescencia y cuantificación .....</b>	<b>81</b>
<b>3.4</b>	<b>Análisis estadístico .....</b>	<b>82</b>
<b>4</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>83</b>
<b>4.1</b>	<b>Papel de la autofagia selectiva de mitocondrias en la fisiología-patología del sistema nervioso .....</b>	<b>85</b>
4.1.1	Herramientas para el estudio de la mitofagia .....	85
4.1.1.1	Herramientas para el estudio <i>in vitro</i> de la mitofagia .....	85
4.1.1.2	Estudio de la mitofagia en la retina .....	93
4.1.2	Estudio comparativo de la mitofagia y la macroautofagia en el ojo del ratón en condiciones fisiológicas .....	97
4.1.2.1	Análisis comparativo de la autofagia y la mitofagia en la córnea .....	97
4.1.2.2	Mitofagia y autofagia en el cristalino .....	100
4.1.2.3	Mitofagia y autofagia en el cuerpo ciliar .....	103
4.1.2.4	Mitofagia y autofagia en la retina .....	104
4.1.3	Mitofagia y masa mitocondrial en los somas y axones de fotorreceptores .....	112
4.1.3.1	Ausencia de altos niveles de mitocondrias en la capa nuclear externa .....	112
4.1.3.2	Hay un transporte axonal de los mitolisosomas desde los segmentos internos de los fotorreceptores hasta la CNE .....	113
4.1.3.3	Comparación de la mitofagia con la autofagia general en las diferentes células de la retina utilizando los animales mCherry-GFP-LC3 .....	117
4.1.4	La mitofagia en la retina en un modelo de degeneracion de fotorreceptores inducido por MNU . .....	120
4.1.4.1	El MNU es un buen modelo farmacologico que induce la muerte de fotorreceptores ....	120
4.1.4.2	El MNU reduce la mitofagia en la CNE aunque hay una acumulación de mitofagosomas en la zona inferior de los SI y son de mayor volumen .....	123
4.1.4.3	El MNU afecta la estructura y organización de conos, bastones y Glía de Müller, habiendo mitolisosomas en estos tipos celulares .....	125
4.1.5	Mecanismo molecular por el que el MNU modula la mitofagia .....	128
4.1.5.1	El MNU induce muerte celular, daño en el DNA y cambios en la morfología de algunos orgánulos esenciales en las células ARPE-19 .....	128
4.1.5.2	El MNU induce mitofagia a dosis bajas y la inhibe a dosis altas por un posible cambio en el pH lisosomal .....	133
4.1.5.3	El MNU modula la mitofagia a través de la vía dependiente de PINK1/Parkin .....	138
4.1.6	Papel neuroprotector de la mitofagia en la degeneración de fotorreceptores .....	140
4.1.6.1	Un incremento de mitofagia protege las células del daño provocado por el MNU .....	140
4.1.6.2	La mitofagia tiene un papel neuroprotector en la degeneración de los conos .....	142
4.1.7	Efectos del MNU en la macroautofagia de la capa nuclear externa .....	145
4.1.7.1	El MNU modula de la misma manera la macroautofagia y la mitofagia: La macroautofagia que vemos en la CNE corresponde a mitofagia .....	145

<b>4.2</b>	<b>Papel de la autofagia en la muerte celular durante el desarrollo embrionario .....</b>	<b>148</b>
4.2.1	Estudio del proceso de fagocitosis en retinas de ratones deficientes de Atg5 .....	149
4.2.1.1	Las retinas deficientes en Atg5 muestran un incremento de células TUNEL y LTR, pero mantienen los mismos niveles de exposición de fosfatidilserina .....	149
4.2.1.2	Las retinas deficientes en Atg5 muestran más fagocitosis que las retinas WT .....	150
4.2.1.3	Las retinas deficientes en Atg5 presentan un bloqueo de degradación de los cuerpos apoptóticos .....	153
4.2.1.4	Las células microgliales de las retinas deficientes en Atg5 presentan alteraciones en la degradación de las células apoptóticas.....	154
4.2.1.5	Las retinas deficientes en Atg5 presentan menores niveles de ATP y alteración en los compartimentos ácidos. ....	156
4.2.2	Estudio del proceso de fagocitosis en retinas de ratones LAP -/- .....	158
4.2.2.1	La fagocitosis asociada a LC3 (LAP) es esencial para la degradación de las células apoptóticas durante el desarrollo de la retina murina .....	158
4.2.2.2	LAP tiene un papel imprescindible en la retina y RPE de ratones adultos .....	160
<b>5</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>163</b>
<b>5.1</b>	<b>Papel de la mitofagia en la degeneración de fotorreceptores .....</b>	<b>165</b>
5.1.1	Herramientas para el estudio de la mitofagia .....	165
5.1.2	Mitofagia y autofagia en el ojo.....	170
5.1.3	La mitofagia en el modelo farmacológico de degeneración de fotorreceptores, estudio con N-Methyl-N-nitrosourea (MNU).....	176
<b>5.2</b>	<b>Papel de la autofagia en la muerte celular durante el desarrollo embrionario .....</b>	<b>186</b>
5.2.1	Hay un déficit en el proceso de degradación de las células apoptóticas en las retinas deficientes de Atg5 .....	186
5.2.2	La fagocitosis asociada a LC3 (LAP) es esencial para la degradación de las células apoptóticas durante el desarrollo de la retina de ratón .....	189
<b>6</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>193</b>
<b>7</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>197</b>
	<b>Anexos .....</b>	<b>221</b>







## Resumen

En esta tesis doctoral hemos investigado el papel de la autofagia selectiva durante el desarrollo y degeneración del ojo de vertebrados. En primer lugar, nos hemos centrado en la mitofagia o la eliminación selectiva de mitocondrias por autofagia. Para este estudio hemos tenido primero que optimizar una serie de herramientas y métodos que nos permiten determinar de una manera cuantitativa, robusta, y lo más importante, *in vivo*, este proceso. Entre estos métodos destacamos el uso de dos animales reporteros para determinar autofagia y mitofagia en tejido. También se han optimizado diferentes inductores e inhibidores de autofagia y mitofagia, controlando sus cinéticas que nos permiten modular el proceso.

Nuestros datos indican que la autofagia predomina en las diferentes partes del ojo durante su desarrollo. En el ojo de adulto, sin embargo, encontramos en la capa nuclear externa (CNE), donde se encuentran los fotorreceptores y la glía de Müller, el epitelio pigmentario y nervio óptico, que toda la actividad autofágica corresponde a mitofagia, mientras que en las otras partes del ojo hay autofagia pero no mitofagia. Por otro lado, hemos demostrado que para que tenga lugar la mitofagia en la CNE, hay un transporte desde el segmento interno a la zona de los somas tanto de los lisosomas como de los mitolisosomas.

Para entender el papel de estos procesos en condiciones de estrés retiniano, hemos utilizado un modelo farmacológico de muerte de fotorreceptores, N-metil-N-nitrosourea (MNU). Hemos descubierto que con un día de tratamiento *in vivo*, empieza la pérdida de fotorreceptores en la zona central de la retina, tanto de conos como de bastones, y se activa la glía de Müller. También produce la alteración de diferentes orgánulos celulares como el retículo endoplasmático y las mitocondrias, y una desorganización y vacuolización del citoplasma. El pH de los lisosomas también se ve afectado alterando por tanto su funcionalidad.

El MNU modula la mitofagia por la vía dependiente de PINK1/Parkin. Induce mitofagia a dosis bajas mientras que a dosis altas disminuye la mitofagia. Ante un bloqueo de mitofagia en la CNE, los mitolisosomas disminuyen en la CNE y se encuentran acumulados en la zona inferior de los segmentos internos de los fotorreceptores, presentando un tamaño mayor que los mitolisosomas de las retinas control. Por último, la

mitofagia presenta un papel neuroprotector de los fotorreceptores ante el daño provocado por el MNU, alargando su supervivencia.

Por otro lado, también hemos querido entender el papel de la autofagia canónica y no canónica en la eliminación de las células apoptóticas que se producen naturalmente durante la neurogénesis retiniana. Hemos visto que Atg5 es esencial para la eliminación de las células apoptóticas durante el desarrollo embrionario de la retina. Las retinas deficientes en Atg5 muestran un bloqueo en la degradación de las células apoptóticas por parte de la microglía, viéndose disminuida la fusión entre autofagosomas y lisosomas. Además, demostramos que la fagocitosis asociada a LC3 (LAP) es esencial para el mantenimiento homeostático y para la neurogénesis durante el desarrollo embrionario de la retina, presentando las retinas deficientes en LAP un fenotipo similar a las retinas deficientes en Atg5. También desarrolla un papel importante en el mantenimiento del epitelio pigmentario de la retina (RPE) y de los fotorreceptores en la retina adulta.

Concluimos que la autofagia selectiva mantiene la supervivencia de los fotorreceptores ante un daño que provoca su degeneración, por lo que proponemos la inducción de mitofagia como una posible terapia para las enfermedades neurodegenerativas. También destacamos el importante papel que tiene la autofagia asociada a LC3 en la eliminación de las células apoptóticas durante el desarrollo para el mantenimiento de la homeostasis de la retina.

## Abstract

In this doctoral thesis we have investigated the role of selective autophagy during the development and degeneration of the vertebrate eye. First, we have focused on the mitophagy or the selective elimination of mitochondria by autophagy. For this study, we first had to optimize a series of tools and methods that allow us to determine this process in a quantitative and robust form, and most important way, *in vivo*. Among these methods we highlight the use of two reporter animals to determine autophagy and mitophagy in tissue. Different inductors and inhibitors of autophagy and mitophagy have also been optimized, controlling their kinetics that allow us to modulate the process.

Our data indicate that autophagy predominates in different parts of the eye during its development. In the adult eye, however, we find in the outer nuclear layer (ONL), where the photoreceptors and Müller glia, the pigmentary epithelium and the optic nerve are located, that all the autophagic activity is mitophagy, while in the other parts of the eye there is autophagy but no mitophagy. On the other hand, we have defined that to take place the mitophagy in the ONL, there is a transport from the internal segment to the area of the somas of both lysosomes and mitolysosomes.

To understand the role of these processes in retinal stress conditions, we have used a pharmacological model of photoreceptor death, N-methyl-N-nitrosourea (MNU). We have discovered that with one day of *in vivo* treatment, the loss of photoreceptors begins in the central area of the retina, both of cones and rods, and Müller glia is activated. We also produce the alteration of different cellular organelles such as the endoplasmic reticulum and mitochondria, and a disorganization and vacuolization of the cytoplasm. The pH of the lysosomes is also affected thereby altering its functionality.

The MNU modulates the mitophagy via the PINK1/Parkin-dependent pathway. MNU induces mitophagy at low doses, while at high doses reduces it. Before a blockage of mitophagy in the outer nuclear layer, the mitolysosomes decrease in the ONL and are accumulated in the lower part of the internal segments of the photoreceptors, presenting a size larger than the mitolysosomes of the control retinas. Finally, the mitophagy has a neuroprotective role of photoreceptors in the face of the damage caused by the MNU, extending its survival.

On the other hand, we also wanted to understand the role of canonical and non-canonical autophagy in the elimination of naturally occurring apoptotic cells during retinal neurogenesis. We have seen that Atg5 is essential for the detection of apoptotic cells during embryonic retinal development. Retinas deficient in Atg5 have a blockage in the degradation of apoptotic cells by the microglia, as the fusion between autophagosomes and lysosomes is diminished. In addition, we demonstrate that LC3 associated phagocytosis (LAP) is essential for homeostatic maintenance and neurogenesis during embryonic development of the retina, presenting retinas deficient in LAP a phenotype similar to Atg5 deficient retinas. It also plays an important role in the maintenance of RPE and photoreceptors in the adult retina.

We conclude that selective autophagy maintains the survival of photoreceptors in the face of damage that causes their degeneration, and therefore proposes the induction of mitophagy as a possible therapy for neurodegenerative diseases. We also highlight the important role that LC3 associated phagocytosis plays in the removal of apoptotic cells during development for the maintenance of retinal homeostasis.

## Abreviaturas

<b>5'-GMP</b>	Guanosín monofosfato
<b>A/O</b>	Antimicina A/Oligomicina
<b>ATG</b>	del inglés, Autophagy-related protein
<b>BSA</b>	del inglés, Bovine serum albumine. Albúmina sérica bovina
<b>cAMP</b>	Adenosin monofosfato cíclico
<b>CCCP</b>	Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone
<b>CCG</b>	Capa de células ganglionares
<b>CENb</b>	Capa externa de neuroblastos
<b>CGR</b>	Células ganglionares de la retina
<b>CINb</b>	Capa interna de neuroblastos
<b>CMA</b>	del inglés Chaperone-mediated autophagy. Autofagia mediada por chaperonas
<b>CNbL</b>	Capa de neuroblastos
<b>CNE</b>	Capa nuclear externa
<b>CNI</b>	Capa nuclear interna
<b>CPE</b>	Capa plexiforme externa
<b>CPI</b>	Capa plexiforme interna
<b>CsA</b>	Ciclosporina A
<b>DABCO</b>	1,4-diazabicyclo-(2,2,2)-octano
<b>DFO</b>	Deferoxamina
<b>DFP</b>	3-Hydroxy-1,2-dimethyl-4(1H)-pyridone
<b>DNA</b>	del inglés, Deoxyribonucleic acid. Ácido desoxirribonucleico
<b>E</b>	Embrionario
<b>EGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
<b>FBS</b>	del inglés, Fetal bovine serum. Suero fetal bovino
<b>FR</b>	Fotorreceptores
<b>GFAP</b>	Proteína gliofibrilar ácida
<b>GM</b>	Glía de Müller
<b>GMPc</b>	Guanosín monofosfato cíclico
<b>GS</b>	Glutamina sintetasa
<b>HBSS</b>	Hank's Balanced Salt Solution
<b>HCQ</b>	Hidroxiclороquina
<b>HIF-1</b>	del inglés, Hypoxia-Inducible factor 1. Factor 1 inducido por hipoxia
<b>LAP</b>	del inglés, LC3-associated phagocytosis. Fagocitosis asociada a LC3
<b>LC3</b>	del inglés, Light chain 3 protein
<b>LES</b>	Lupus eritematoso sistémico
<b>LIR</b>	del inglés, LC3-interacting region. Región de interacción con LC3
<b>LMP</b>	del inglés, Lysosomal membrane permeabilization. Permeabilización de la membrana lisosomal
<b>LTR</b>	LysoTracker Red

<b>MCR</b>	Muerte celular regulada
<b>MEMNEAA</b>	MEM Non-Essential Amino Acids Solution
<b>Mfn1</b>	Mitofusina 1
<b>Mfn2</b>	Mitofusina 2
<b>MME</b>	Membrana mitocondrial externa
<b>MMI</b>	Membrana mitocondrial interna
<b>MNU</b>	N-metil-N-nitrosourea
<b>mtDNA</b>	DNA mitocondrial
<b>MTDR</b>	MitoTracker Deep Red
<b>NADPH-NOX2</b>	Nicotamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa-2
<b>NR</b>	Neuroretina
<b>OXPHOS</b>	Sistema de fosforilación oxidativa
<b>P</b>	Postnatal
<b>PCR</b>	del inglés, Polymerase Chain Reaction
<b>PDE6</b>	Fosfodiesterasa 6
<b>PE</b>	Fosfatidiletanolamina
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>PI3K</b>	Fosfoinositol 3-quinasa
<b>PI3KC3</b>	Complejo de fosfatidilinositol 3-quinasa
<b>PI3P</b>	Fosfatidilinositol 3-fosfato
<b>PKC</b>	Proteína Kinasa C alpha
<b>P-L-Ser</b>	del inglés, Phospho-L-Serine. Fosfo-L-serina
<b>PMAP</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos
<b>PMM</b>	Permeabilización de la membrana mitocondrial
<b>PS</b>	Fosfatidilserina
<b>qPCR</b>	del inglés, quantitative Polymerase Chain Reaction
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>RMCE</b>	del inglés, Recombination-mediated cassette exchange
<b>RNA<sub>m</sub></b>	RNA mensajero
<b>ROS</b>	del inglés, Reactive oxygen species. Especies reactivas de oxígeno
<b>RP</b>	Retinosis pigmentaria
<b>RPE</b>	del inglés, Retinal pigmented epithelium. Epitelio pigmentario de la retina
<b>RRP</b>	Receptores de reconocimiento de patrones
<b>RRPt</b>	Reconocimiento de patógenos
<b>SDS</b>	Sodium Dodecyl Sulfate
<b>SE</b>	Segmento externo
<b>SI</b>	Segmento interno
<b>SN</b>	Sistema nervioso
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>TdT</b>	del inglés, Terminal deoxynucleotidyl Transferase. Enzima transferasa terminal de desoxinucleótidos
<b>TFEB</b>	del inglés, Transcription factor EB. Factor de transcripción EB
<b>TL</b>	del inglés, Tomato lectin. Lectina de tomate

**TLR**

**TUNEL**

**5'-GMP**

**A/O**

del inglés, Toll-like receptors. Receptores “Toll-like”

del inglés, TdT-mediated dUTP Nick End Labelling

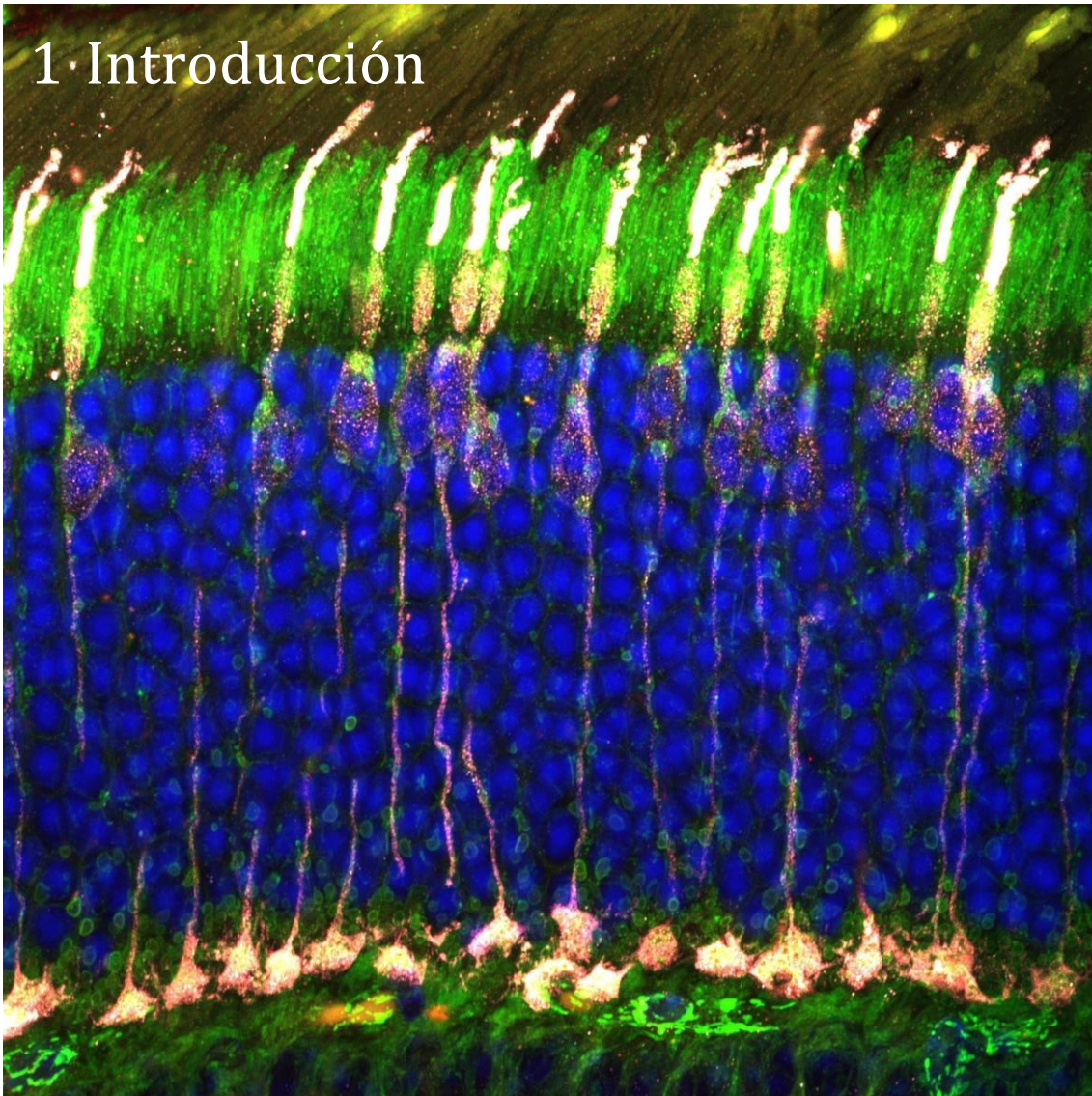
Guanosin monofosfato

Antimicina A/Oligomicina





# 1· Introducción



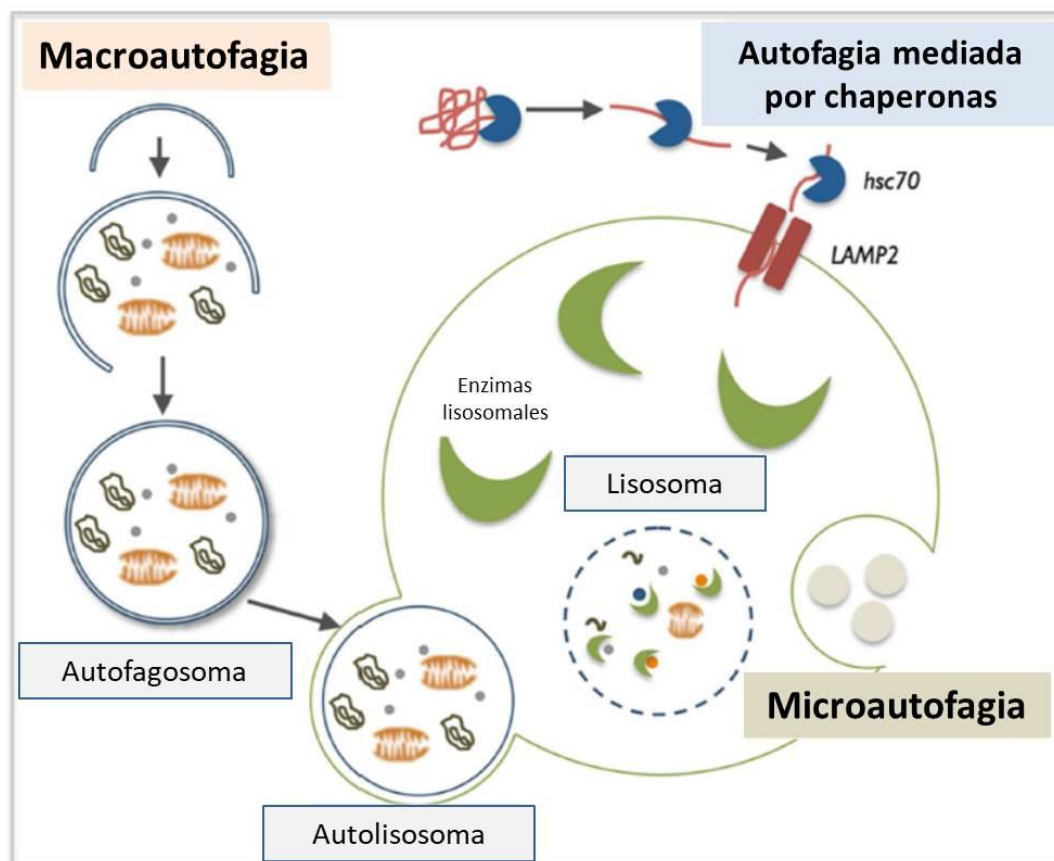


## 1.1 La autofagia: Características generales

La palabra autofagia, derivada de la palabra griega “Auto-comerse”, se refiere a los procesos catabólicos a través de los cuales la célula degrada y recicla los componentes celulares [1]. Para ello, el material celular e incluso orgánulos enteros se segregan en un orgánulo con doble membrana denominado autofagosoma. El material secuestrado será degradado por las enzimas del lumen lisosomal cuando el lisosoma se fusiona con el autofagosoma [2]. En respuesta al estrés, la autofagia media la degradación de los componentes celulares, los cuales se reciclan para generar los nutrientes y las estructuras celulares necesarias para mantener la homeostasis celular. Además, desempeña un papel importante en el control de la calidad celular, particularmente en las neuronas, en las que los componentes celulares como proteínas alteradas u orgánulos dañados no se pueden reducir mediante la redistribución a las células hijas a través de la división celular [3].

Hay tres tipos principales de autofagia, que se clasifican según la forma en que el material llega a los lisosomas (**Figura 1.1**):

1. **Macroautofagia:** El material citoplásmico se envuelve en una estructura de doble membrana que finalmente se cierra para formar el autofagosoma. Estos orgánulos se fusionan con los lisosomas, en los cuales las hidrolasas ácidas degradan el material [4]. Este proceso se explica detalladamente en el apartado 1.1.1.
2. **Autofagia mediada por chaperonas (CMA):** Ocurre solo en células de mamíferos y permite la degradación selectiva de proteínas que expresan una secuencia de aminoácidos específica que es reconocida por la chaperona Hsc70 [4]. CMA solo degrada las proteínas solubles que tienen un “KFERQ-like”, que es un motivo vinculado a Hsc70 [5], pero no orgánulos, ni macromoléculas como los lípidos, ácidos nucleicos o proteínas integrales de membranas [6]–[8].
3. **Microautofagia:** El material destinado a la degradación llega al lisosoma a través de la invaginación de la membrana lisosomal o endosomal [9]. Este proceso es menos conocido y los primeros reguladores moleculares se empiezan a describir.



**Figura 1.1. Los diferentes tipos de autofagia.** **a.** La macroautofagia se caracteriza por el secuestro de estructuras destinadas a la degradación en las vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas. Los autofagosomas completos, primero, se fusionan con los endosomas y finalmente vuelcan su contenido al interior hidrolítico lisosomal. Los metabolitos resultantes se transportan al citoplasma y se usan para la síntesis de nuevas macromoléculas o como fuente de energía. **b.** Durante la autofagia mediada por chaperonas, las proteínas que portan la secuencia del tipo KFERQ del pentapéptido son reconocidas por la chaperona Hsc70, que luego se asocia con la proteína de membrana lisosomal LAMP-2A, lo que desencadena su oligomerización. Este evento lleva a la translocación de la proteína unida en el interior del lisosoma a través de un proceso que requiere Hsc70. **c.** La microautofagia implica el reclutamiento de componentes específicos cerca de la membrana lisosomal, que posteriormente se invagina al interior lisosomal. Modificado de [2].

### 1.1.1 Macroautofagia

La macroautofagia, más conocida como autofagia, es una vía intracelular que media la degradación de componentes citosólicos que incluyen proteínas, lípidos y orgánulos completos [2]. Es el tipo de autofagia mejor caracterizada ya que mientras que la microautofagia y la CMA no están asociadas con grandes cambios morfológicos en los compartimentos vesiculares, las respuestas macroautofágicas involucran vesículas que pueden ocupar (en un momento determinado) una parte considerable del citoplasma, un fenómeno impresionante que llamó la atención a Christian de Duve a finales de la década

de 1950 [1]. Estas vesículas, se conocen como autofagosomas y pueden secuestrar grandes porciones del citoplasma, incluyendo orgánulos completos o partes de los mismos.

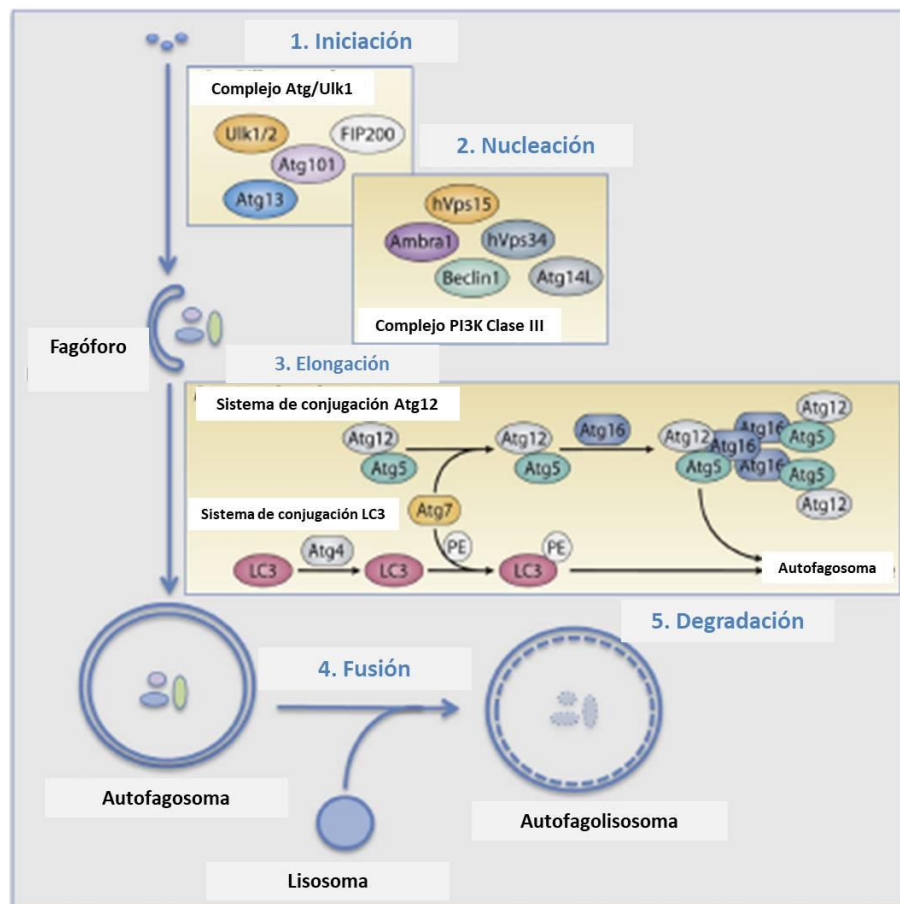
Todas las etapas del proceso, desde la inducción hasta la formación del autofagosoma y su fusión con el lisosoma, están reguladas por miembros de la familia de proteínas ATG (autophagy-related). Hasta la fecha, más de 35 genes ATG han sido identificados en participar en el proceso de autofagia [10]. A partir de este momento voy a denominar a la macroautofagia como autofagia.

### 1.1.1.1 Fases de la autofagia: Formación de autofagosoma

La formación del autofagosoma es la fase inicial del proceso de la autofagia y la etapa principal donde se produce la regulación (**Figura 1.2**):

1. Comienza con una **fase de iniciación**, durante la cual la quinasa ULK1 forma un complejo con ATG13, ATG101 y FIP200 (también conocido como RB1CC1).
2. La actividad quinasa de ULK1 desencadena la formación del complejo fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), compuesto por Vps34, Beclin-1, Vps15 y Vps14, lo que favorece la formación de fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) en sitios de iniciación del fagóforo, promoviendo así la **fase de nucleación** [11].
3. Dos sistemas de conjugación de tipo ubiquitina catalizados por ATG7 se activan durante la **fase de elongación**. El primer sistema media la conjugación de ATG12 a ATG5, mientras que en el segundo ATG7 media la conjugación de fosfatidiletanolamina (PE) a LC3 (light chain 3 protein) para formar el autofagosoma unido a la forma de LC3 (el ortólogo de mamíferos de ATG8), también llamado LC3-II. El ensamblaje continuo de estos complejos proteína-proteína y proteína-lípidos y el envío de lípidos al autofagosoma a través de ATG9, la única proteína de expansión multimembrana, permite la elongación de la membrana del autofagosoma [11], [12].
4. La etapa final de la autofagia está controlada por moléculas que regulan la maduración del autofagosoma, su fusión con endosomas y lisosomas, y reciclaje de los metabolitos desde el lisosoma.





**Figura 1.2. Pasos en la formación del autofagosoma.** El proceso de formación de autofagosomas comprende una fase de inicio y elongación en la que dos complejos de proteínas permiten la formación de la membrana de aislamiento. Esta membrana crece durante la fase de nucleación para formar el autofagosoma maduro. La fusión del autofagosoma con lisosomas permitirá la degradación del material envuelto durante la fase de degradación. Modificado de [3].

#### 1.1.1.2 Receptores y adaptadores de autofagia

Un receptor de autofagia es cualquiera de las proteínas que se unen a los sustratos de la autofagia, permitiendo su reconocimiento por la maquinaria de autofagia así como su degradación dentro de los lisosomas [13]. La mayoría de los receptores para autofagia comparten una región de interacción con LC3 conservada evolutivamente (LIR; LC3-interacting region), lo que les permite atraer sustratos de autofagia en la proximidad de los de autofagosomas. Esto se aplica a las proteínas p62, NBR1, OPTN, NDP52, BNIP3, BNIP3L, ATG34, FUNDC1, PHB2, TRIM5, TAX1BP1, ATG19 y ATG32 [14]–[16]. Muchos receptores de macroautofagia también contienen dominios de unión a ubiquitina, lo que les permite reclutar sustratos ubiquitinados para formar autofagosomas [17].

Aunque el término “adaptador de autofagia” también se ha utilizado como sinónimo “receptor de autofagia”, se recomienda emplear esta expresión para indicar cualquiera de las proteínas que interactúan con miembros de la familia Atg8, pero no están involucrados en el reconocimiento de la carga [13]. Dos ejemplos de adaptadores de autofagia fuera de la familia de proteínas ATG son FYVE y su dominio FYCO1, que participa en la interacción de los autofagosomas con el citoesqueleto y su fusión con los lisosomas, y la SNX18, que participa en la formación del autofagosoma [18], [19].

#### **1.1.1.3 Regulación de la autofagia**

La autofagia es principalmente una respuesta celular al estrés, y se induce clásicamente por falta de nutrientes, especialmente de aminoácidos. Este proceso está estrechamente regulado a través de la señalización de mTOR y AMPK, que son las dos vías principales responsables de monitorizar el estado nutricional de la célula [20]. Otras fuentes de estrés, como el estrés oxidativo del retículo endoplásmico (RE), la hipoxia y las infecciones también pueden inducir autofagia. A pesar de que la autofagia se regula principalmente a nivel postraducciona, el estrés también puede aumentar la expresión del RNAm (RNA mensajero) de los genes de autofagia [21]. Uno de los principales reguladores de estos genes es el factor de transcripción EB (TFEB). En condiciones de reposo TFEB es retenido en el citoplasma, pero una vez fosforilado se transloca al núcleo donde activa la transcripción de los genes relacionados con el lisosoma y los genes ATG que median la regulación de la vía completa de autofagia incluyendo muchas de las proteínas del lisosoma [22].

#### **1.1.1.4 Flujo de autofagia**

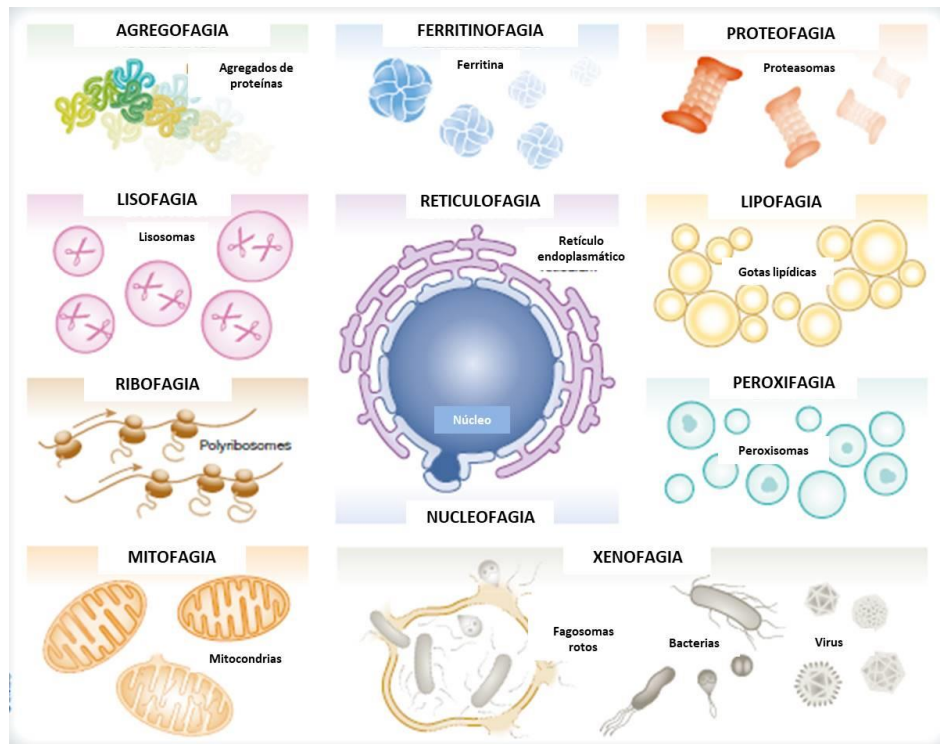
La autofagia es altamente dinámica, ya que es un proceso mediante el cual los autofagosomas se forman y se fusionan con el lisosoma, y tiene una duración de menos de diez minutos. Es importante destacar que LC3B está unido a la membrana autofagosomal, y las proteasas lisosomales degradan LC3-II, la parte unida a la membrana externa vuelve al citosol, después de que Atg4 rompa la conexión con PE [23]. LC3B es uno de los marcadores de autofagosomas que más se utiliza, de hecho, la cantidad relativa de LC3-II es proporcional al número de autofagosomas [24]. Pero, debido al dinamismo de los autofagosomas, es necesario determinar el flujo autofágico [25]. Así, si se produce un bloqueo bien de la maduración o fusión lisosomal del autofagosoma o bien de la alteración



de la función o biogénesis del lisosoma, se va a producir la acumulación de autofagosomas, y en última instancia, la interrupción o disminución del flujo autofágico [2]. Este bloqueo se puede inducir mediante inhibidores lisosomales para estudiar el flujo autofágico, lo que permite determinar la cantidad de autofagosomas que se forman en una determinada ventana de tiempo [26].

### 1.1.1.5 Autofagia selectiva

La autofagia se consideró inicialmente como un proceso no selectivo, sin embargo, pruebas recientes han indicado que este proceso es altamente selectivo. La autofagia selectiva se refiere a un proceso de reconocimiento y degradación específicos de carga, tales como orgánulos dañados, proteínas mal plegadas, o patógenos intracelulares [27]. La autofagia selectiva está mediada por un mecanismo de reconocimiento de cargas específicas mediante la unión de receptores o adaptadores que contienen las regiones que interactúan con LC3 (LIR) [13]. La macroautofagia selectiva se puede clasificar en varios tipos según las naturalezas de sus cargas específicas (**Figura 1.3**) como la xenofagia (degradación de patógenos), lipofagia (degradación de los lípidos) y agregofagia (degradación de los agregados de proteínas) [28]–[30]. Adicionalmente, la macroautofagia específica de orgánulos se puede clasificar en ER-fagia (autofagia del retículo endoplasmático), peroxifagia (degradación autofágica de los peroxisomas) y mitofagia (degradación autofágica de las mitocondrias) [31]–[34]. La autofagia selectiva está implicada en muchas enfermedades. Por ejemplo, la agregofagia es crítica para la eliminación de agregados de proteínas patogénicas vinculadas a enfermedades neurodegenerativas, incluida la enfermedad de Alzheimer [35], [36].



**Figura 1.3. Sustratos de autofagia.** Un conjunto amplio y heterogéneo de entidades citoplásmicas, ya sean de origen endógeno/intracelular o exógeno/extracelular, puede dirigirse a la degradación lisosomal mediante formas de autofagia no selectivas o selectivas. Modificado de [37].

En esta tesis nos vamos a centrar en la **mitofagia** como forma de autofagia selectiva. La mitofagia es el proceso por el cual las mitocondrias son selectivamente engullidas por autofagosomas para su degradación en el interior de los lisosomas [33], [38]. Generalmente, la mitofagia es responsable de eliminar las mitocondrias dañadas [39]. Sin embargo, en ciertas circunstancias la mitofagia también media la eliminación de las mitocondrias durante el desarrollo, por ejemplo, durante la diferenciación de eritrocitos y maduración de lentes [39]. Nuestro laboratorio ha demostrado que la eliminación específica y selectiva de mitocondrias a través de la mitofagia es esencial durante el desarrollo de la retina, específicamente para la correcta diferenciación de las células ganglionares de la retina (CGR) [40]. La mitofagia se desarrolla en el **apartado 1.2**.

### 1.1.2 Autofagia en la fisiología y la patología

El descubrimiento de los genes ATG, originalmente en levaduras y posteriormente en organismos multicelulares, ha proporcionado un avance importante en la comprensión de la macroautofagia y de sus funciones en fisiología y enfermedades [41], [42] (**Figura 1.4**).



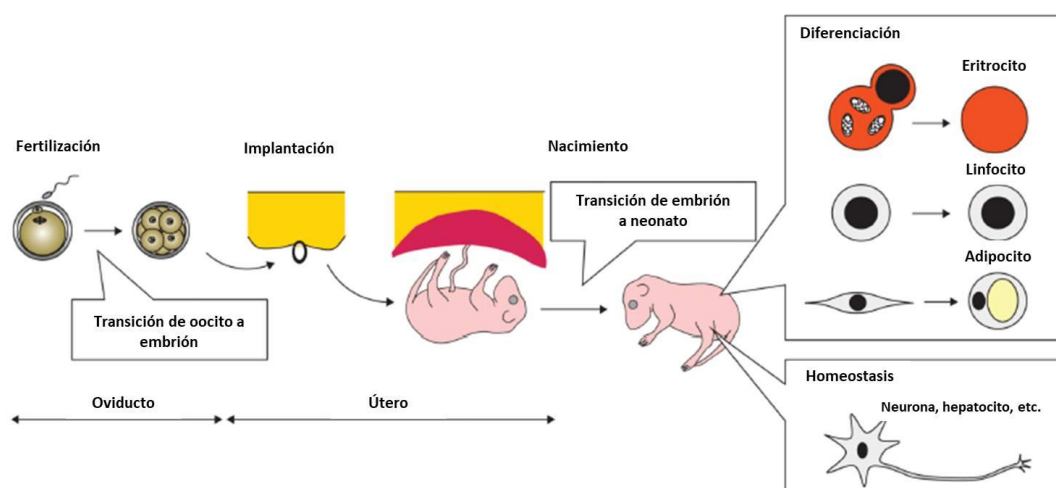
**Figura 1.4. Funciones fisiológicas y patológicas de la autofagia.** El papel fisiológico de la autofagia basal es limpiar el citoplasma de orgánulos dañados y agregados de proteínas. Esta función es esencial para la aptitud celular al limitar la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS). La estimulación de la autofagia durante los períodos de inanición desempeña un papel importante en muchos tejidos, pero con algunas excepciones, como el cerebro, que proporciona nutrientes para el metabolismo celular, para la biosíntesis de macromoléculas y para mantener el nivel de ATP. La autofagia está involucrada en una etapa temprana de desarrollo (preimplantación del ovocito fertilizado) y en la diferenciación. La autofagia disminuye durante el envejecimiento, y la restauración de la autofagia prolonga la vida útil de varias especies. La autofagia contribuye tanto a la inmunidad innata como a la adaptativa. La autofagia defectuosa se observa en muchas enfermedades humanas y su estimulación es beneficiosa en la mayoría de los casos. La autofagia desempeña un papel más complejo en el cáncer, ya que puede ser un mecanismo supresor de tumores, pero también puede convertirse en un mecanismo citoprotector en los tumores, donde contribuye a la supervivencia celular en un contexto de estrés metabólico y en respuesta a tratamientos contra el cáncer. Modificado de [43].

### 1.1.2.1 Funciones fisiológicas de la autofagia: desde el desarrollo hasta el envejecimiento

La formación de autofagosomas se produce a un ritmo basal en la mayoría de las células y controla la calidad del citoplasma al iniciar la eliminación de agregados de proteínas y de orgánulos dañados [44] (**Figura 1.4**). Este control de calidad dependiente de la autofagia también es importante para limitar la producción de ROS (*Reactive oxygen species*). La estimulación de la autofagia durante los períodos de privación de nutrientes es una respuesta conservada evolutivamente al estrés en los organismos eucariotas [1]. En condiciones de ayuno, la degradación de las proteínas y los lípidos permiten a la célula adaptar su metabolismo y satisfacer sus necesidades energéticas (**Figura 1.4**). La estimulación de la autofagia juega un papel importante justo tras el nacimiento, ya que se encarga de mantener los niveles de energía en varios tejidos después de que cesa el

suministro de nutrientes maternos a través de la placenta [45]. Además, la autofagia inducida por el ayuno de nutrientes es citoprotectora al bloquear la inducción de la apoptosis [46].

La autofagia es esencial durante el desarrollo y la diferenciación (**Figura 1.5**). El periodo de preimplantación después de la fertilización de ovocitos depende de la degradación autofágica de los componentes del citoplasma de ovocitos [45]. La autofagia es crucial para la diferenciación y homeostasis de las células inmunes y contribuye a la regulación de la tolerancia y la diferenciación de las células T [47], [48]. Así mismo, numerosos estudios incluyendo los de nuestro laboratorio han demostrado que animales deficientes en autofagia tienen alteraciones en la diferenciación neuronal [40].



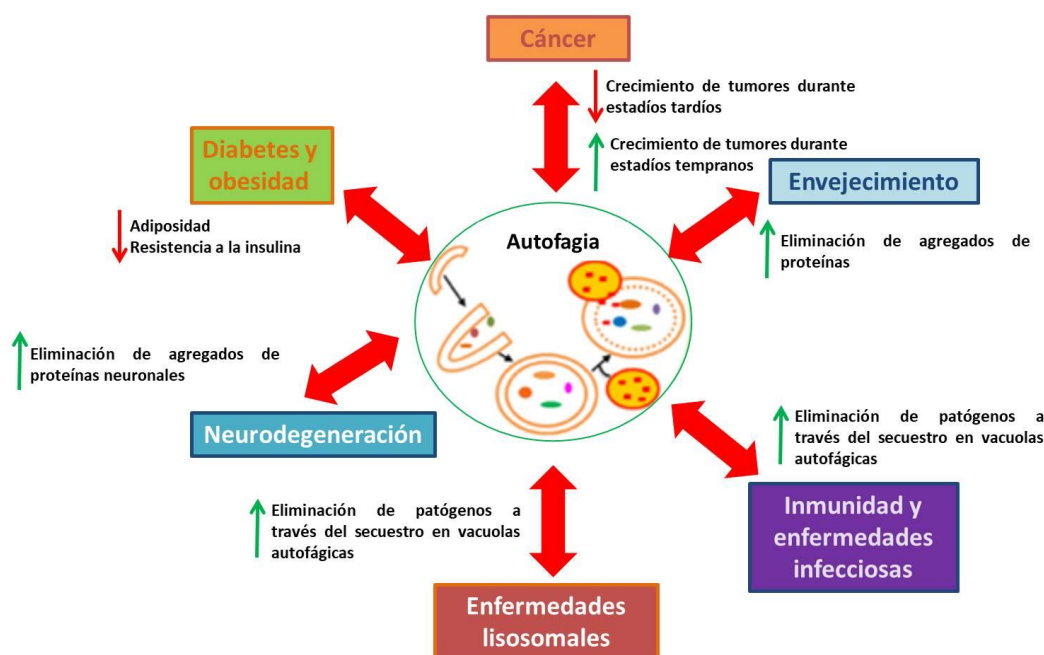
**Figura 1.5. El papel de la autofagia en el desarrollo y diferenciación en mamíferos.** La autofagia tiene papeles críticos en ovocitos y neonatos fertilizados a través del catabolismo de proteínas y la producción resultante de los aminoácidos necesarios. La autofagia también es importante en la remodelación celular (por ejemplo, en la eliminación mitocondrial) durante la diferenciación de eritrocitos, linfocitos y adipocitos. Finalmente, el papel de la autofagia en el mantenimiento de la homeostasis es importante, particularmente en las células diferenciadas terminalmente como las neuronas y los hepatocitos, en los cuales es esencial la renovación continua de los contenidos citoplasmáticos. Modificado de [49].

Durante el envejecimiento, hay una disminución en la actividad autofágica en todos los tejidos examinados hasta la fecha. Las razones exactas de esta reducción de la actividad autofágica con la edad se desconocen por completo, pero se ha propuesto que se debe a un defecto en la función lisosomal [50]. En algunos casos como en la retina murina se ha observado una disminución en la expresión de algunos reguladores de autofagia, como *Atg7* o *Beclin1* [51]. La acumulación de material de desecho no se limita a los lisosomas. El reciclaje de orgánulos dañados o desgastados (es decir, mitocondrias, peroxisomas) y agregados de proteínas citoplásmicas también se ve comprometido contribuyendo a la

disfunción celular [52]. En particular, la incapacidad de la célula para eliminar el daño a las mitocondrias y su consiguiente acumulación citosólica es bastante perjudicial, ya que inicia un círculo vicioso de mayor producción de ROS y un aclaramiento autofágico defectuoso [53]. Por otro lado, la inducción de autofagia aumenta la longevidad en muchas especies [54]. El efecto antienvejecimiento de la autofagia probablemente depende, al menos en parte, de su función de control de calidad que limita la acumulación de proteínas propensas a la agregación y mitocondrias dañadas [55].

### 1.1.2.2 Funciones patológicas de la autofagia: desde el cáncer, la inmunidad hasta las enfermedades neurodegenerativas

Alteraciones de la autofagia han sido implicadas en diferentes enfermedades como el cáncer, la neurodegeneración y enfermedades del sistema inmunitario [56] (**Figura 1.6**).



**Figura 1.6. Papel de la autofagia en diversas patologías.** El papel de la autofagia en el envejecimiento se explica por la eliminación de proteínas agregadas. Del mismo modo, en los trastornos neurodegenerativos, la acumulación de proteínas neuronales se ha atribuido a ser eliminado por autofagia. De manera equivalente, la autofagia muestra un papel protector en la eliminación de los componentes almacenados lisosómicos y, por lo tanto, se reducen los trastornos del almacenamiento lisosomal. Por otro lado, la autofagia también ha demostrado ser beneficiosa para evadir varios patógenos extraños, contribuyendo así a la inmunidad innata. Se ha demostrado que el papel de la autofagia en la diabetes y la obesidad disminuye la adiposidad y la resistencia a la insulina. En el contexto del cáncer, la autofagia ha demostrado que desempeña una doble función, ya que sirve como supresor de tumores durante las etapas iniciales, pero protege a las células tumorales en las etapas posteriores. Modificado de [57].

La autofagia afecta a varios aspectos de la progresión del cáncer. Alta actividad autofágica se cree que es citoprotectora y que suprime la iniciación del cáncer. Sin

embargo, en los tumores primarios, la autofagia a menudo se regula incrementándose para superar las consecuencias resultantes de un crecimiento rápido (como el estrés proteico) así como de la baja disponibilidad de nutrientes (privación) dentro de la masa tumoral [58]. La autofagia puede adquirir un papel de supresor de tumores o bien ser un promotor tumoral [59], [60]. Además, la deficiencia en Atg5 o Atg7 puede inducir tumores hepáticos en ratones [61]. La autofagia ayuda en el crecimiento y progresión de los tumores debido a la capacidad de reducir los estímulos ambientales. Estudios en tumores muestran un aumento del flujo autofágico [62].

Por otro lado, la autofagia ha sido implicada en gran variedad de funciones inmunes, como la eliminación de bacterias intracelulares [63], la secreción de citoquinas inflamatorias [64], control de la inflamación, presentación de antígenos [65], [66] y desarrollo de linfocitos [67].

Como las neuronas son células postmitóticas y no pueden someterse a citocinesis, las proteínas agregadas no pueden ser diluidas por división celular. Por lo tanto, la base común de la enfermedad neurodegenerativa que es la acumulación de agregados de proteínas anormales dentro de las células neuronales se puede evitar a través de la degradación autofágica. La autofagia es un regulador de los niveles de agregados de proteínas, como la huntingtina poliglutamina en la enfermedad de Huntington [68]; la  $\alpha$ -sinucleína mutante en la enfermedad de Parkinson [69]; el mutante TDP-43 en ALS 7 y proteínas tau en algunas demencias [70]. Además, en la enfermedad de Parkinson hay deficiencia en los genes Pink1 y Parkin, lo que data de la importancia de la mitofagia en esta enfermedad. Además de su papel en la mitofagia, Parkin ha sido involucrada en la degradación de la  $\alpha$ -sinucleína [71].

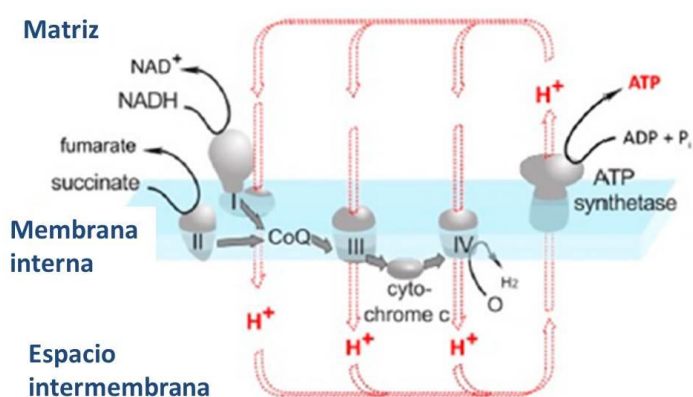
## 1.2 Autofagia selectiva: Mitofagia

### 1.2.1 Mitocondria

Las mitocondrias son orgánulos descendientes de las antiguas alfa-proteobacterias. La presencia de dos membranas (la membrana externa altamente permeable y la membrana interna, que separa la matriz del ambiente), la presencia de sus propios ribosomas y el DNA (*deoxyribonucleic acid*) de doble cadena circular en las mitocondrias se explica por su origen [72].



Una de las funciones mitocondriales principales es la producción de energía mediante el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS), generando aproximadamente un 90% de la energía celular [73] (**Figura 1.7**). Este proceso genera ATP mediante la transferencia de electrones a través de complejos de proteínas que se encuentran dentro de la membrana mitocondrial interna (MMI). En el proceso, se consume oxígeno y se establece un gradiente electroquímico que impulsa la síntesis de ATP, generando un gradiente de pH y un potencial de membrana ( $\Delta\Psi_m$ ) a lo largo de la MMI. También, el ciclo TCA (llamado ciclo de Krebs o ciclo del ácido cítrico), se realiza dentro de la matriz mitocondrial [72]. Además las mitocondrias juegan un papel importante en la señalización intracelular, la apoptosis, la homeostasis del centrosoma y la fidelidad mitótica y la expresión génica cromosómica [74]. Además, las mitocondrias tienen una gran importancia en el proceso de desarrollo, diferenciación y proliferación de células y tejidos tanto de manera normal como anormal (por ejemplo, tumorigénesis) [75].

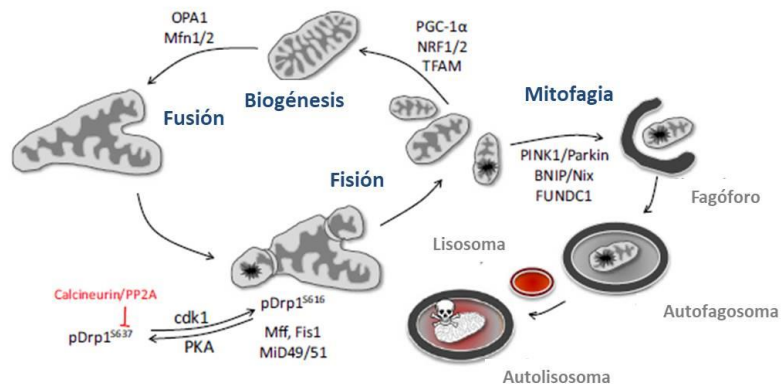


**Figura 1.7. Representación esquemática de componentes de la fosforilación oxidativa dentro de la membrana mitocondrial interna.** Los sustratos como el malato (complejo I; IC) o el succinato (complejo II; CII) donan los electrones que son finalmente aceptados por el oxígeno para producir agua. En el proceso, los protones se bombean fuera de la mitocondria para generar una fuerza electroquímica que impulsa la síntesis de ATP. Modificado de [72].

Las mitocondrias forman un retículo funcional cuya morfología está regulada por la dinámica de fisión, fusión y diferentes procesos dinámicos. Múltiples proteínas están involucradas en la remodelación de las membranas mitocondriales (**Figura 1.8**). La fusión mitocondrial está mediada por la acción de al menos tres GTPasas. Mitofusina 1 (Mfn1) y Mitofusina 2 (Mfn2) están integradas dentro de la membrana mitocondrial externa (MME). Sus dominios de GTPasa regulan la reacción de fusión. Otra GTPasa similar, Opa1, reside en el espacio intermembrana, donde se asocia con la membrana interna. La fisión mitocondrial se basa en otra GTPasa, DRP1. DRP1 oligomeriza en estructuras en forma de anillo alrededor de los sitios de fisión, para contraer el orgánulo de una manera dependiente

de GTP. De hecho, DRP1 forma puntos en la membrana mitocondrial, algunos de los cuales marcan los sitios de fisión futuros. Además, otras proteínas han demostrado funcionar en tándem con las GTPasas descritas anteriormente, y por lo tanto tienen una relación directa o indirecta con la fisión y la fusión [76]. Otra parte esencial dentro de la dinámica mitocondrial es la degradación selectiva de mitocondrias por mitofagia.

**Figura 1.8. Representación esquemática de los procedimientos dinámicos de las mitocondrias.** La síntesis/biogénesis mitocondrial lleva a la fusión mitocondrial, mientras que la fisión lleva a la degradación de las mitocondrias mediante mitofagia. Se muestran las enzimas implicadas en cada uno de los procesos. Modificado de [77].

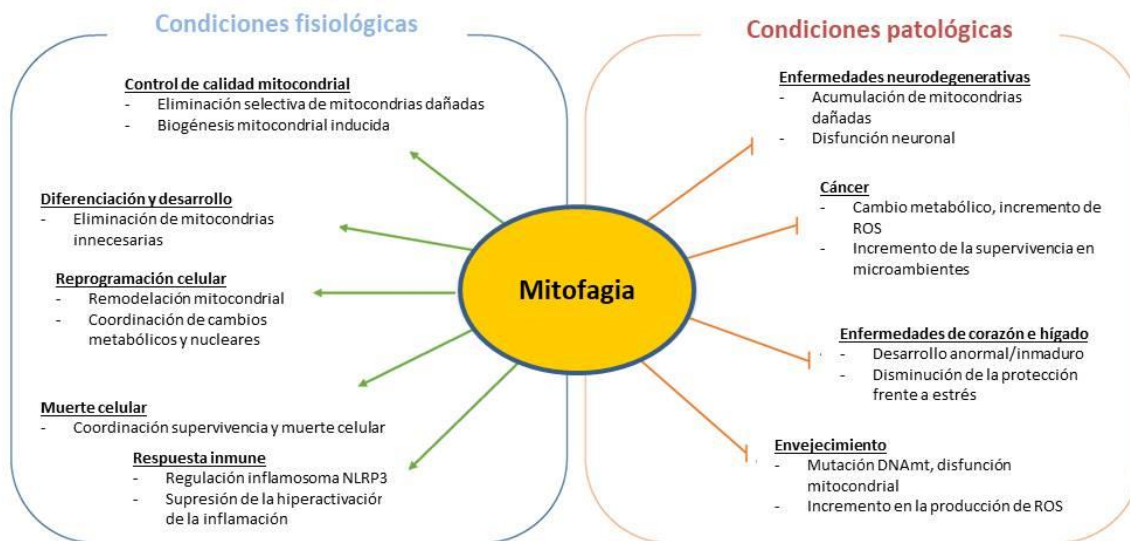


## 1.2.2 La Mitofagia

### 1.2.2.1 Funciones de la mitofagia

La mitofagia es un proceso de eliminación selectiva de mitocondrias utilizando la maquinaria autofágica. La mitofagia juega un papel esencial en el control de calidad y homeostasis de la mitocondria. Disfunciones mitocondriales y mitofagia defectuosa están relacionadas con enfermedades neurodegenerativas, cáncer, y enfermedades metabólicas. Además, estudios recientes han mostrado la implicación de la mitofagia en la diferenciación y desarrollo, lo que sugiere que la mitofagia puede jugar un papel más activo en el control de las funciones celulares [40], [78] (**Figura 1.9**).





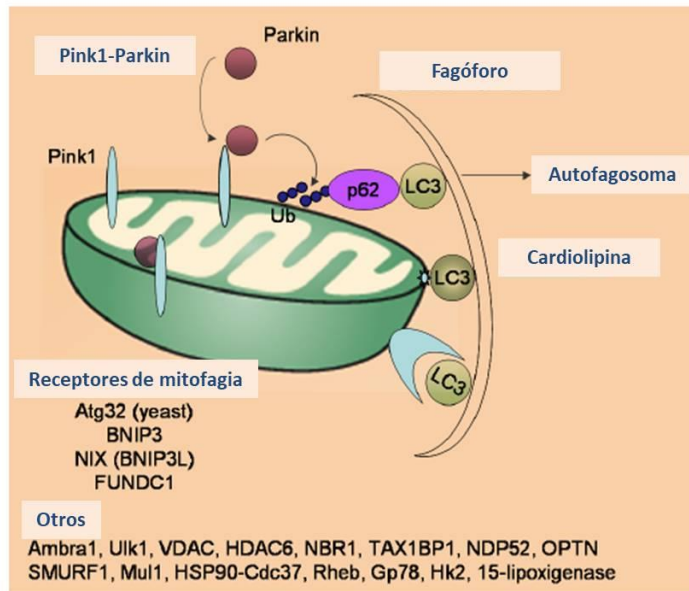
**Figura 1.9. El papel de la mitofagia en la fisiología normal y en las enfermedades humanas.** La mitofagia juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de las mitocondrias y diversos aspectos de la función celular. Estos roles son críticos para prevenir el desarrollo de enfermedades humanas y disfunciones relacionadas con el envejecimiento. Modificado de [78].

Hay dos tipos de mitofagia: la mitofagia encargada de eliminar mitocondrias dañadas y la que degrada mitocondrias funcionales, también llamada mitofagia programada [39]. Ante un estrés moderado, la eliminación de mitocondrias dañadas en las que se produce permeabilización de la membrana mitocondrial (PMM) y ROS, la mitofagia constituye un mecanismo citoprotector [79].

### 1.2.2.2 Reguladores de la mitofagia

Desde que John Lemasters utilizó el término "mitofagia" en 2005, la mitofagia ha sido muy estudiada. En particular, estudios que sugieren que el desarrollo de la enfermedad de Parkinson está asociada con una alteración de la mitofagia, han llevado a un aumento de interés en este proceso. En 2006, los grupos de Jongkyeong Chung y Ming Guo identificaron simultáneamente la función de PINK1 y la función de Parkin en la enfermedad de Parkinson, y en 2008, el grupo de Richard Youle demostró que Parkin media la eliminación de mitocondrias dañadas [80], [81]. Así, la vía PINK-Parkin surgió como una vía reguladora clave de la mitofagia [82]. Por otro lado, se han reportado receptores mitocondriales tales como BNIP3, NIX/BNIP3L, FUNDC1, y Atg32 en levaduras, y varias proteínas reguladoras de la mitofagia como AMBRA1, MUL1, AMFR, SMURF y RHEB han sido identificadas [83], [84] (**Figura 1.10**). Todos los mecanismos reguladores de la mitofagia llevan a cabo la formación del autofagosoma alrededor de la mitocondria que va a ser degradada y conllevan la unión de LC3 a un receptor, como p62-

Ub, BNIP3, NIX o cardiolipina. Las vías de mitofagia más conocidas son las llevadas a cabo PINK1-Parkin y la vía de BNIP3/BNIP3L, que serán descritas posteriormente.

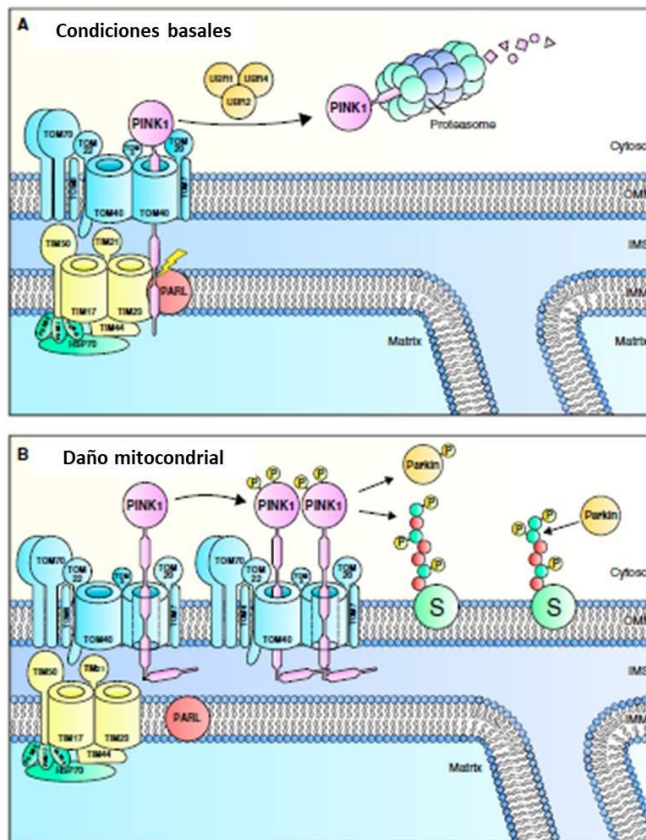


**Figura 1.10. Esquema de la mitocondria con los diferentes reguladores y receptores de la mitofagia.** Se muestra la vía de PINK1-Parkin y diferentes receptores de mitofagia así como otras proteínas implicadas.

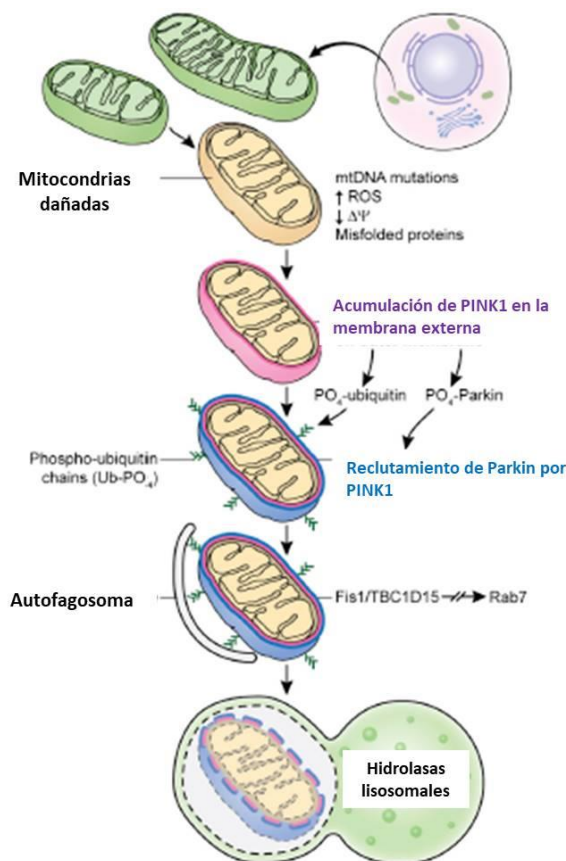
### 1.2.2.3 Vía de degradación de las mitocondrias por PINK1/Parkin

Específicamente, la proteína quinasa asociada a la mitocondria PINK1 y la ubiquitina ligasa RBR E3 citosólica de Parkin juegan un papel crítico en la mitofagia inducida tras daño mitocondrial. En condiciones basales, los niveles de PINK1 celulares permanecen bajos debido a su degradación constitutiva en las mitocondrias. PINK1 actúa como un sensor molecular de daño mitocondrial; la despolarización de la membrana mitocondrial inhibe la escisión de PINK1 y su degradación, lo que lleva a su acumulación en la MME. El posterior reclutamiento de Parkin citosólica a la mitocondria depende de la activación de PINK1. La fosforilación mediada por PINK1 tanto de Parkin como de ubiquitina en sus respectivos residuos de serina 65 son necesarios para que Parkin se active completamente [85]–[87] (**Figura 1.11**).

**Figura 1.11. PINK1 se estabiliza en el exterior de la membrana mitocondrial tras estrés mitocondrial y desencadenantes de mitofagia.** (A) En condiciones basales, PINK1 se escinde de la mitocondria y se dirige al proteasoma para la degradación. (B) Bajo condiciones de estrés o daño mitocondrial, PINK1 no puede ser procesado y se estabiliza en el exterior de la membrana mitocondrial, donde se fosforila Parkin y ubiquitina (círculos rojos). Parkin es luego reclutada por ubiquitina fosforilada y es a su vez fosforilada por PINK1. IMM, membrana mitocondrial interna; IMS, espacio intermembrana; OMM, Membrana mitocondrial externa. Modificado de [86].



Parkin cataliza la conjugación *de novo* y el alargamiento de las cadenas de ubiquitina preexistentes en una gran cantidad de proteínas de la MME, que sirven como sustratos de PINK1. Este aumento de cadenas de fosfoubiquitina en mitocondrias despolarizadas hace que el proceso finalice en mitofagia [88]. La ubiquitinación de proteínas de la MME permite el reclutamiento de receptores de mitofagia que poseen un dominio de unión a la ubiquitina además de un motivo LIR. Esto incluyen p62/SQSTM1, OPTN, NDP52, TAX1BP1 y NBR1 [89]. La utilización de la tecnología de edición del genoma ha revelado que NDP52 y OPTN son los receptores esenciales para la mitofagia, con una menor contribución de TAX1BP1, mientras que NBR1 y p62 son prescindibles [90], [91]. Sorprendentemente, se reclutan OPTN y NDP52 a la mitocondria incluso en ausencia de Parkin y daño mitocondrial, y esto es suficiente para inducir la mitofagia, aunque a un nivel muy bajo [90] (**Figura 1.12**).



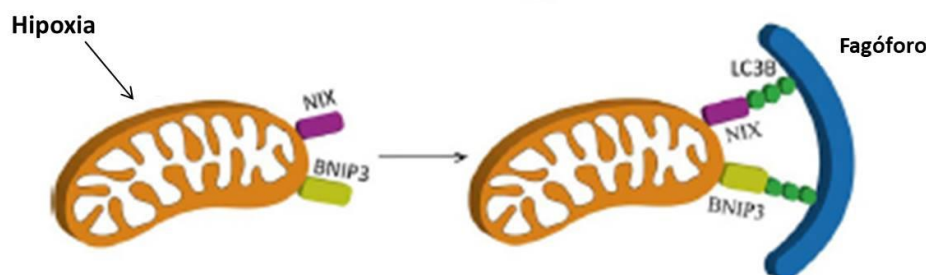
**Figura 1.12. Modelo de mitofagia inducida por Parkin.** Las mitocondrias disfuncionales (mitocondria amarilla) estabilizan a PINK1 en la membrana mitocondrial externa (MME). Después de la acumulación de PINK1, éste fosforila la ubiquitina y a Parkin para activar la actividad de la ligasa E3 de Parkin. Parkin activa la ubiquitinación de sustratos en las mitocondrias para llevar a cabo dos procesos divergentes: el reclutamiento del autofagosoma y la degradación por el proteasoma de sustratos mitocondriales ubicuos. FIS1 es un receptor en la membrana externa que une dos proteínas, TBC1D15 y TBC1D17, que participan en el desarrollo de la membrana de aislamiento LC3 para generar el autofagosoma alrededor de las mitocondrias dañadas. El autofagosoma se fusiona con el lisosoma para su degradación. Modificado de [87].

#### 1.2.2.4 Via de degradación de las mitocondrias por NIX/BNIP3

Bnip3 (BCL2/adenovirus E1B 19 kDa que interactúa con la proteína 3) y su homólogo Bnip3L/Nix son miembros atípicos de la subfamilia de proteínas pro-apoptóticas Bcl-2 [92], compartiendo el 56% de la identidad de secuencia de aminoácidos. Ambos, tras la expresión, se insertan en la MME a través de sus dominios transmembrana C-terminales, con el extremo N orientado hacia el citoplasma [93]. En la mitocondria, los dominios BH3 de Bnip3 [93] y Nix [94] suprimen la función de las proteínas Bcl-2 antiapoptóticas. Además de sus funciones apoptóticas, se describió que Bnip3 desencadenaba autofagia [95] y mitofagia [96] (**Figura 1.13**).

Datos de nuestro laboratorio, demuestran que la mitofagia basal juega un papel esencial durante el desarrollo de la retina. Esta mitofagia está regulada por la hipoxia y HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor 1), gen diana de BNIP3L / NIX, que desencadena la eliminación mitocondrial mediante mitofagia y conlleva un cambio metabólico hacia la

glucólisis imprescindible durante el desarrollo retinal [40]. Al igual, Nix media el aclaramiento mitocondrial durante el desarrollo de las células sanguíneas [97], [98].



**Figura 1.13. Mecanismo de mitofagia mediado por BNIP3 y Nix.** BNIP3 y Nix son proteínas transmembrana ubicadas en mitocondrias. Cuando se estabilizan en respuesta a la hipoxia, ambos son capaces de unirse a LC3B directamente y reclutar la mitocondria al autofagosoma. Modificado de [77].

Bnip3 es inducido por hipoxia y se localiza en la MME a través de un dominio transmembrana. La actividad de Bnip3 LIR requiere la fosforilación de la serina 17, y se ve reforzada por la fosforilación de la serina 24. Aún no se han identificado la (s) quinasa (s) y fosfatasa (s) responsable (s). La actividad Bcl-xL de pro-supervivencia funciona para mejorar la unión de Bnip3 a LC3. Nix contiene un motivo idéntico de SWxxL LIR y se somete a una regulación similar por fosforilación [99].

### 1.2.2.5 Mecanismos de compensación entre las vías de mitofagia

Existen diferentes mecanismos de interacción entre las vías de mitofagia descritas hasta ahora. Además de promover el reclutamiento mediado por ubiquitina de diferentes proteínas, así como la degradación de proteínas de membrana mitocondrial externa, PINK1 y Parkin interaccionan directamente con el complejo Beclin1-PI3K que promueve la nucleación del autofagosoma. Más específicamente, PINK1 interacciona directamente con el complejo Beclin1-PI3K para activar la autofagia [100], y Parkin interacciona con Ambra1, un activador de Beclin1, facilitando su reclutamiento a la mitocondria despolarizada para activar el complejo PI3K de clase III [101].

En el año 2010, Ding y colaboradores describieron que NIX prepara a la mitocondria para su degradación por mitofagia controlando la localización mitocondrial de Parkin bajo despolarización mitocondrial [102]. La despolarización mitocondrial con CCCP (Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone) restaura la mitofagia incluso en reticulocitos deficientes de NIX, demostrando la presencia de mecanismos de compensación independientes de NIX para mediar mitofagia. Además, la ubiquitinización de NIX



mediada por Parkin recluta al receptor de mitofagia NBR1 [103]. Carolyn M. Sue y colaboradores, identificaron a Nix como un mediador alternativo de la mitofagia para mantener la función mitocondrial, compensando la alteración de la mitofagia mediada por PINK1/Parkin en fibroblastos derivados de la enfermedad asintomática de los portadores homocigotos de la mutación de Parkin. Mediante la inducción genética y farmacológica, confirmaron la capacidad de Nix para activar la mitofagia alternativa, que resultó en la mejora de la función mitocondrial de Parkin y células de pacientes con Parkinson relacionadas con PINK1 [104].

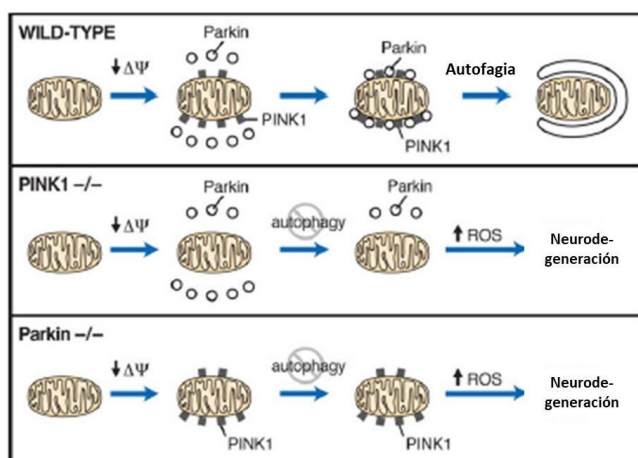
#### ***1.2.2.6 Papel de la mitofagia en la fisiología y la patología***

La mitofagia tiene un papel esencial en el control de calidad y homeostasis de la mitocondria, las disfunciones mitocondriales y mitofagia defectuosa se han visto en enfermedades neurodegenerativas, cáncer y enfermedades metabólicas. Además, en estudios recientes se ha mostrado su implicación en diferenciación y desarrollo [40], [78]. Durante estos procesos, se entiende que el papel principal de la mitofagia es eliminar mitocondrias cuando no son necesarias. En estos últimos años se ha demostrado también que la mitofagia programada es esencial para la reprogramación metabólica hacia la glucólisis que está asociada con la diferenciación celular. Más importante aún, se ha demostrado que la neurogénesis durante la diferenciación neuronal de los mamíferos depende de un aumento marcado en la mitofagia [40]. En ratones knockout de Nix, las mitocondrias no se eliminan de los eritrocitos y, en consecuencia, la anemia se desarrolla debido a una disminución en la supervivencia [98]. El daño mitocondrial y la desregulación de la mitofagia han sido implicados en varias enfermedades neurodegenerativas incluyendo enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Huntington [105], [106]. Como evidencia más directa, la mutación de PINK1 y Parkin han sido identificados en la enfermedad de Parkinson [107], [108]. Se ha visto que las mitocondrias se acumulan en el cerebro de los pacientes con enfermedad de Parkinson. Por ello, se ha propuesto la hipótesis de que Parkin y PINK1 previenen la inflamación y la neurodegeneración mediante la degradación de mitocondrias dañadas, previniendo así el incremento en DNA mitocondrial (mtDNA) citosólicos y circulantes [109]. La supresión de Parkin también ha sido relacionada con el desarrollo de diferentes tumores [110].

### 1.2.2.7 Estrés oxidativo y mitofagia

El estrés oxidativo es creado por el desequilibrio entre la producción de ROS y la eliminación de intermediarios tóxicos por sistemas antioxidantes [111]. El descubrimiento de mutaciones recesivas en PINK1 se relaciona con la enfermedad de Parkinson [107] y proporciona el enlace entre la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo en dicha enfermedad [112], [113]. Es conocido el papel de PINK1 en la protección contra la muerte celular inducida por el estrés oxidativo en enfermedades neurodegenerativas [114]. Los niveles de Parkin aumentan cuando se expone al estrés oxidativo con  $H_2O_2$  en la lente del ojo [114]. Parkin se traslada a mitocondrias despolarizadas tras la exposición al estrés oxidativo y recluta p62/SQSTM1. Se ha demostrado que la eliminación de Parkin de las mitocondrias dañadas produce una reducción de los niveles de ROS y un aumento de la supervivencia tras la exposición al estrés oxidativo. Estos resultados establecen que la función de Parkin para eliminar las mitocondrias despolarizadas/dañadas por la exposición al estrés oxidativo y, que la eliminación de la mitocondria dañada por Parkin, es importante para la homeostasis y la supervivencia celular [115].

Por otro lado, se ha relacionado la pérdida de PINK1 o Parkin con el aumento de ROS (**Figura 1.14**). La hipótesis es que los mecanismos por los cuales las mutaciones de pérdida de función en PINK1 y Parkin causan Parkinson es que la deficiencia de estos genes disminuye la mitofagia y provoca una acumulación de mitocondrias disfuncionales que depende de la edad, lo que conllevaría un aumento de ROS y a la neurodegeneración de células susceptibles [116].



**Figura 1.14. Funciones normales de PINK1 y Parkin (arriba) y posibles mecanismos de neurodegeneración causados por deficiencia de PINK1 (PINK1 -/-) o deficiencia de Parkin (Parkin -/-).** La autofagia selectiva de las mitocondrias disfuncionales a través de las actividades combinadas de PINK1 y Parkin puede ser importante para eliminar una fuente celular principal de especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden dañar las proteínas, los lípidos y el DNA. En ausencia de PINK1 o Parkin, la acumulación de mitocondrias disfuncionales con el tiempo puede conducir a un aumento de ROS y, eventualmente, causar neurodegeneración. Modificado de [116].

Esto sugiere que aumentar los niveles de PINK1 o de su actividad como quinasa puede ser otra opción para el desarrollo terapéutico de las enfermedades neurodegenerativas.

#### 1.2.2.8 Técnicas para el estudio de mitofagia en los tejidos

Actualmente, existen diferentes métodos actuales para visualizar la dinámica mitocondrial en los tejidos de mamíferos.

(1) Microscopía electrónica. Este método visualiza las mitocondrias rodeadas de membranas autofágicas/lisosómicas y proporciona una detección rigurosa de la mitofagia. Sin embargo, este método requiere un ojo experto para una cuantificación precisa y a menudo es un reto identificar tipos de células específicos en tejidos heterogéneos.

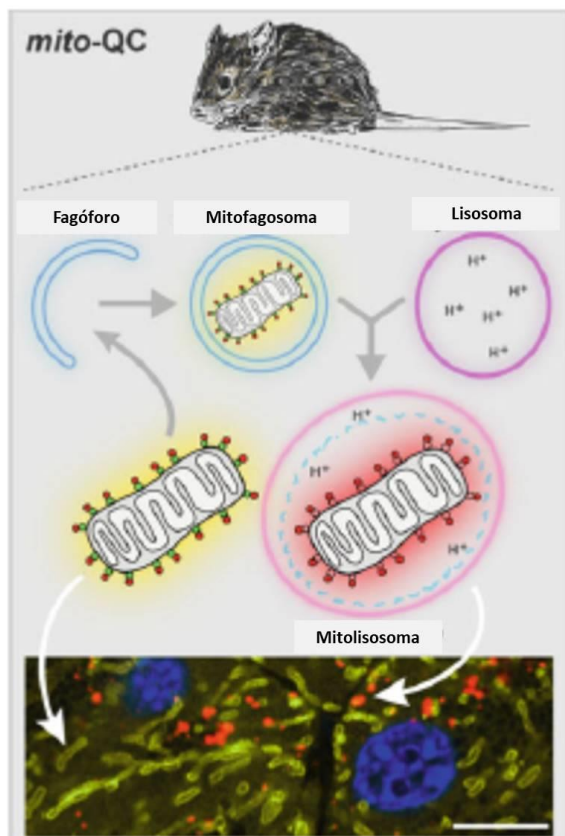
(2) Colocalización basada en inmunofluorescencia de mitocondrias con autofagosomas o lisosomas. Esto no puede distinguir con precisión entre autofagia y mitofagia, ya que es probable que se formen autofagosomas no específicos en las mitocondrias [117], [118]. Adicionalmente, se necesita una tinción de anticuerpos sensible y específica, así como un procesamiento cuidadoso del tejido para preservar los epítomos y permitir la penetración de anticuerpos en el tejido.

(3) Sondas radiométricas de fluorescencia. Mt-keima es una proteína fluorescente sensible al pH dirigida a la matriz mitocondrial que se ha utilizado con éxito para estudiar la mitofagia *in vitro* [119], [120]. Recientemente, Sun y colaboradores [121], describieron el ratón Mt-Keima basándose en el mismo concepto, pero mt-Keima en los tejidos tiene limitaciones considerables. La proteína Keima es incompatible con fijación y también puede exhibir superposición espectral. Por lo tanto, no es factible investigar la mitofagia con precisión y resolver la morfología mitocondrial dentro de diferentes subtipos celulares marcados *in vivo*.

Para sortear estos problemas, el grupo de Ian Ganley llevó a cabo un ensayo de fluorescencia [122]. Este ensayo se basa en la expresión de un tándem mCherry-GFP fusionado con la secuencia de la proteína de membrana mitocondrial externa, FIS1. En condiciones basales, la red mitocondrial se ve fluorescente tanto en rojo como en verde; sin embargo, en la mitofagia, las mitocondrias se liberan a los lisosomas donde permanece la fluorescencia mCherry estable, pero la fluorescencia de GFP se apaga por el microambiente ácido. Esto da lugar a la aparición de focos puntuales de mCherry (en rojo) que se pueden cuantificar fácilmente como índice de mitofagia celular. Por ello, para resolver el problema



de la mitofagia *in vivo*, generaron un ratón transgénico que llamaron Mito-QC, para estudiar la mitofagia *in vivo* [123] (**Figura 1.15**). En el **apartado 3.1.2.3** de material y métodos de esta tesis se explica en detalle la generación de este ratón.



**Figura 1.15. Modelos de ratón Mito-QC.** El ensayo de Mito-QC se basa en una construcción de un tándem de mCherry-GFP. Esta construcción está dirigida a las mitocondrias a través de la adición de una secuencia de direccionamiento mitocondrial de 51 aminoácidos derivado de la proteína de la membrana mitocondrial externa, FIS1. La construcción resultante mCherry-GFP-FIS1 (Mito-QC) es observable como una señal fluorescente roja y verde, que cuando se fusiona aparece amarilla. Cuando las mitocondrias son envueltas por el fagóforo y se fusiona con el lisosoma, formando un mitofagosoma, aparece solo los puntos rojos mCherry, debido a las propiedades ácido-lábiles de GFP. Esto proporciona cuantificaciones de mitofagia fáciles y permite observar la morfología mitocondrial *in vitro* e *in vivo*. Modificado de [123].

### 1.3 Autofagia no canónica

#### 1.3.1 Mecanismos de autofagia no canónica

La formación del autofagosoma mediante la vía canónica, implica tanto una actividad jerárquica de proteínas ATG, como de otras proteínas no ATG como pueden ser PtdIns3KC3, p150, AMBRA1 y DFCP1. Sin embargo existen vías alternativas a la autofagia canónica que no utilizan las típicas proteínas involucradas en alargamiento y cierre de los autofagosomas como son ATG7, ATG5 y LC3, y otras vías que evitan las proteínas que son importantes para la iniciación como ULK1 o para la nucleación como BECLIN1 [124].

Recientemente, la fagocitosis asociada a LC3 (LAP) fue identificada como una vía de autofagia no canónica [125] que usa proteínas de autofagia como LC3 y Atg5 para la formación de fagocitos y degradación de componentes extracelulares como las bacterias o

las células apoptóticas [126]. El mecanismo LAP es descrito con más detalle en el siguiente apartado (1.3.1.1).

#### **1.3.1.1 Fagocitosis asociada a LC3 (LAP)**

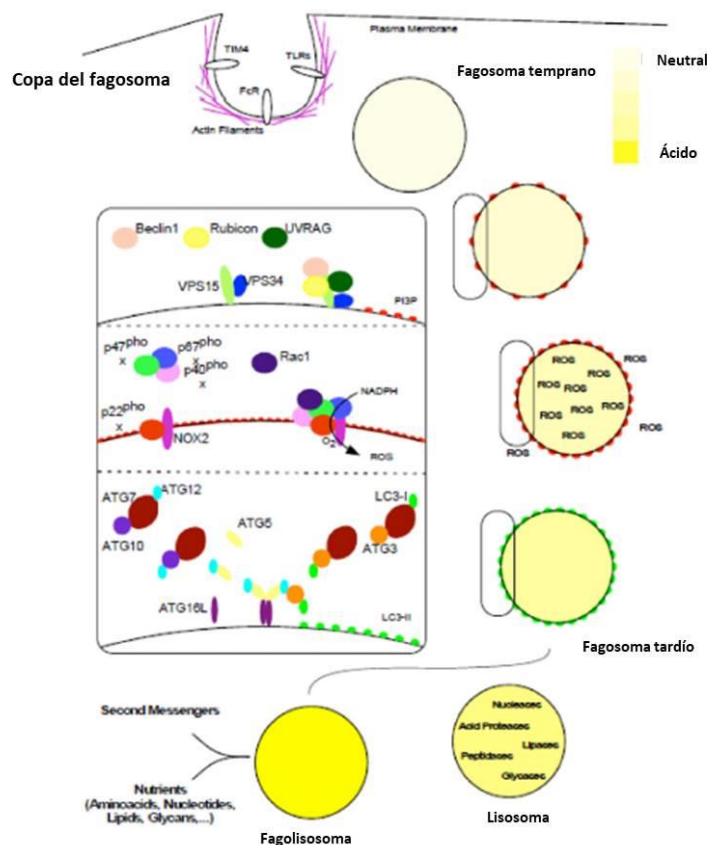
La asociación a LC3 ha sido considerada durante mucho tiempo un sello distintivo y exclusivo de los autofagosomas. LC3 es una proteína citosólica similar a la ubiquitina, que tras la activación de la autofagia canónica se une covalentemente a PE en la membrana del autofagosoma [127]. Sin embargo, se ha visto que LC3 se puede conjugar con PE en el contexto de "single-membrane". Nos referimos a estos procesos que dirigen LC3 a una sola membrana como "autofagia no canónica" [128].

Ejemplos de estas vías de autofagia no canónica incluyen LAP, como hemos visto anteriormente, donde LC3 se lipida en fagosomas de una única membrana tras engullir patógenos bacterianos y fúngicos o células necróticas y apoptóticas [126], [129], [130]. Un evento similar de lipidación LC3 similar a LAP es visto durante la macropinocitosis y la entosis [129]. También ha sido recientemente descrito que diferentes fármacos que poseen propiedades lisosomotóxicas o ionóforos, incluyendo monensina, CCCP y cloroquina, son capaces de activar autofagia no canónica e inducir la lipidación de LC3 en compartimentos de una sola membrana del endolisosoma.

##### **1.3.1.1.1 Mecanismo y vía de señalización de LAP**

Para entender LAP, primero debemos distinguir cómo las células, en particular los fagocitos, identifican la carga que se debe internalizar para su degradación. Los receptores de superficie en la membrana plasmática de las células fagocíticas, incluidos los macrófagos, pueden unirse a los ligandos que están presentes en las partículas diana. Una serie de receptores de membrana plasmática están involucrados en la detección de carga y la captación de partículas que conducen a LAP. Receptores de reconocimiento de patrones (RRP), como los receptores "toll-like" (TLR, en particular, TLR1/2, TLR2/6 y TLR4) son capaces de detectar diversos patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP), receptores de inmunoglobulina (Ig) que reconocen partículas extrañas al sistema inmunitario, y los receptores que median la eliminación de los cuerpos celulares como el TIM4 que unen fosfatidilserina (PS) son codificados en la lámina externa de la membrana plasmática después de la muerte celular. Son los principales receptores de la superficie

celular que se ha demostrado que participan en la detección de la carga durante LAP [130]–[132] (**Figura 1.16**).



**Figura 1.16.** Vía molecular de fagocitosis asociada a LC3. La carga en la superficie es detectada por receptores ubicados en la membrana plasmática del fagocito. Cuando la membrana plasmática se cierra alrededor de la carga extracelular (no representada), la copa del fagosoma se sella en un fagosoma temprano producido en el citosol del fagocito. Luego, el fagosoma temprano madura para convertirse en un fagosoma tardío en un proceso que involucra modificaciones de membrana y generación de ROS. Los lisosomas contienen hidrolasas y, por fusión al fagosoma tardío, se transfieren al lumen del fagosoma y la carga del fagosoma se degrada, lo que produce nutrientes y segundos mensajeros. Los tres paneles en el recuadro representan la maquinaria molecular en la ruta: el complejo PI3KC3 (panel superior) produce PI3P, el complejo NOX2 (panel central) es responsable de la generación del estrés oxidativo. Los dos sistemas de conjugación tipo UB (panel inferior) lipidiación de LC3 en las membranas del fagosoma. Modificado de [130].

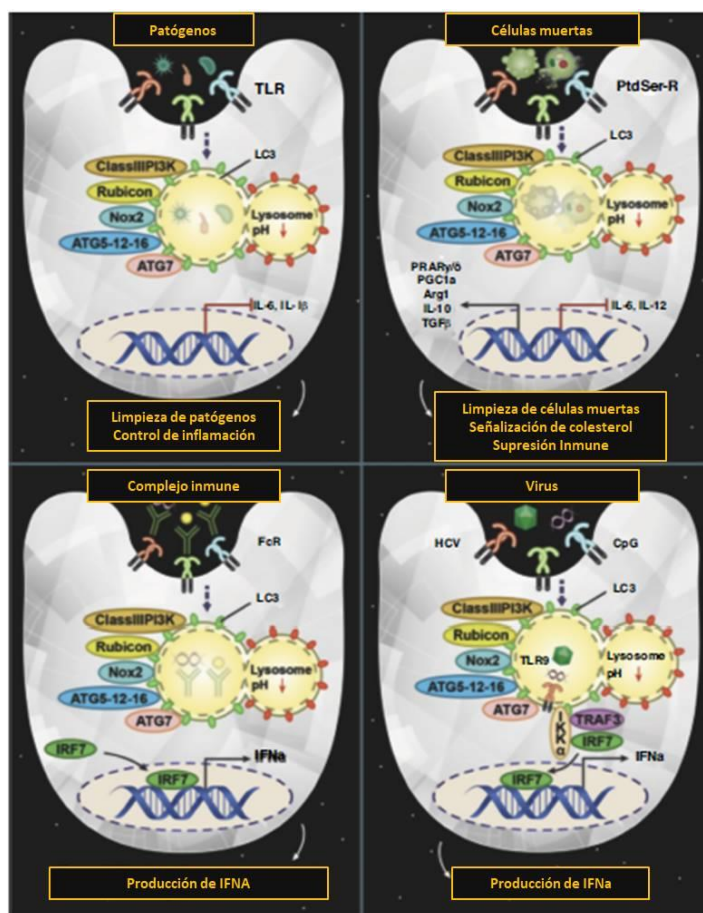
Después del reconocimiento de la carga fagocítica y después de la formación del fagosoma, el complejo PI3K es el primer complejo multiproteínico involucrado en la regulación de LAP (**Figura 1.16, recuadro superior**). Los componentes principales del complejo PI3KC3 son VPS34, VPS15 y Beclin1 [133]. Además de Beclin1 y VPS15/34, el complejo PI3KC3 requiere que las subunidades adicionales sean completamente funcionales. UVRAG y Rubicon son necesarios para LAP [131]. La deficiencia de Rubicon reduce la generación de PI3P por VPS34 en las membranas del fagosoma tras la inducción de LAP, lo que conlleva consecuencias, como la producción de ROS y la lipidiación de LC3 [131].

Además de PI3P, también se ha visto la importancia de ROS en la activación de LAP. La nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa-2 (NOX2) genera ROS durante la maduración de fagosomas en macrófagos [134], [135] y tanto la función de NOX2 como de ROS son indispensables para LAP [131], [136], [137]. NOX2 es un

complejo multiproteico compuesto de subunidades unidas a la membrana y citosólicas (**Figura 1.16, sección intermedia**). Como último paso hay dos sistemas ubiquitina que permiten llevar a cabo la lipidación de LC3 en la membrana de los fagosomas, formados principalmente por ATG12–ATG5–ATG16L1 [138] (**Figura 1.16, sección inferior**).

#### 1.3.1.1.2 Estímulos de activación de LAP y funciones

LAP se activa en respuesta a múltiples estímulos, como puede ser en respuesta a patógenos, donde suprime la inflamación y elimina estos patógenos, bien sean bacterias, parásitos, hongos o virus. También es activado por células muertas así como en el sistema inmune es necesaria su activación para la producción de IFN $\alpha$  [139] (**Figura 1.17**).



**Figura 1.17. Diferentes formas de inducción de LAP.** Patógenos, células apoptóticas, el complejo inmune y los virus, reconocidos por sus correspondientes receptores activan LAP. Modificado de [139].

LAP tiene múltiples funciones, entre las que destacamos su papel en la muerte celular, en el RPE, así como su función en el sistema inmunitario que se desarrollan a continuación.

### 1.3.1.1.2.1 LAP y muerte celular

LAP está implicada en eferocitosis, donde se lleva a cabo la eliminación de células apoptóticas por macrófagos. Los fagocitos profesionales, específicamente los macrófagos, eliminan de manera eficiente las células muertas para evitar la liberación de señales inflamatorias por parte de éstas, y así mantener la homeostasis del tejido. La fagocitosis de células apoptóticas activa un potente mecanismo regulador que induce activamente la producción de citoquinas antiinflamatorias (IL-10, TGF- $\beta$ ) e inhibe la producción de citoquinas inflamatorias y quimiocinas tales como IL-6, IL-1 $\beta$ , CCL-2, CCL-3, CCL-4 y CXCL-10 [140]–[142]. LAP media la inmunorregulación en respuesta a las células apoptóticas, y los ratones que son deficientes en LAP, pero no para la autofagia canónica, acumulan cuerpos apoptóticos en sus tejidos y dentro del citosol de las células fagocíticas. Se postula que los defectos en el aclaramiento de las células moribundas subyacen a la patogénesis del lupus eritematoso sistémico (LES). Los ratones que carecen de moléculas asociadas con el aclaramiento de las células muertas desarrollan una enfermedad similar a LES, y los fagocitos de pacientes con LES a menudo muestran un aclaramiento defectuoso y una mayor producción de citoquinas inflamatorias cuando se exponen a las células moribundas *in vitro*. Las células muertas, inyectadas en animales con deficiencia de LAP, están engullidas pero no se degradan de manera eficiente, y desencadenan un incremento de las citoquinas proinflamatorias [143]. Además, los pacientes con granulomatosis crónica, un síndrome causado por mutaciones en NOX2, un componente importante de la cascada de señalización de LAP detallada anteriormente, tienen una alta incidencia de lupus [144].

### 1.3.1.1.2.2 LAP en el epitelio pigmentario de retina

El epitelio pigmentario de la retina (RPE) es una monocapa de células localizada inmediatamente adyacente a la capa de fotorreceptores de la retina neural. La circulación retiniana proporciona nutrientes a las capas celulares internas de la retina, mientras que los fotorreceptores, que se encuentran en la superficie externa de la retina, obtienen apoyo metabólico del RPE [145]. Además de proporcionar nutrición a las células fotorreceptoras, el RPE realiza la fagocitosis de los segmentos externos (SE) de los fotorreceptores [146], [147]. El deterioro de la función normal del RPE puede llevar a la muerte de los fotorreceptores. La disfunción en cualquier aspecto de la fagocitosis puede conducir a la acumulación de fagosomas que contienen SE no digeridos [148]. Por otro lado, se ha visto



que la autofagia no canónica, pero no la autofagia convencional, está activa en el RPE y reintroduce la vitamina A en el ciclo visual [149]. La ausencia de LAP en el RPE produce entre otras cosas aumento en el número de mitocondrias, activación de la microglía, así como el depósito de proteínas inflamatorias [149]. Las células del RPE promueven LAP mediante la expresión de RUBCN/Rubicon (dominio RUN y dominio rico en cisteína que contiene la proteína que interactúa con Beclin1) y suprimen la autofagia mediante la activación de EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico). Por la mañana, cuando la fagocitosis de los SE y el LAP son más altos, la expresión de RUBCN aumenta. Al mismo tiempo, la fagocitosis del segmento externo activa el EGFR, lo que resulta en la estimulación MTOR, la acumulación de SQSTM1/p62 y la fosforilación de Beclin 1, suprimiendo así la autofagia. Silenciar Rubcn, prevenir la actividad de EGFR o inducir directamente la autofagia en células del RPE por privación de nutrientes inhibe la degradación fagocítica de los SE. Por lo tanto, las células del RPE regulan las vías lisosómicas durante el período crítico de la fagocitosis de los SE para apoyar la homeostasis retiniana [150]. La fagocitosis del RPE por la mañana coincidió también con la conversión enzimática de la proteína autofagia LC3 a su forma lipídica. LC3 asociado con fagosomas de membrana única que contienen SE en su interior, es dependiente de Atg5. La importancia de este proceso se verificó en ratones con células RPE deficientes en Atg5, que presentaban un procesamiento lisosómico interrumpido. Estos ratones también exhibieron una disminución de las respuestas de los fotorreceptores a los estímulos de luz y una disminución de los niveles de cromóforos que se restauraron con suplementos de retinoides exógenos. Estos resultados establecieron que la interacción de la fagocitosis y la autofagia dentro del RPE es necesaria tanto para la degradación de los SE como para el mantenimiento de los niveles de retinoides para la visión [151].

#### *1.3.1.1.2.3 LAP en el sistema inmunitario*

LAP tiene una función principal en la respuesta inmune. Generalmente promueve la fusión del fagolisosoma que resulta en una mayor destrucción microbiana. Sin embargo, varios agentes patógenos han desarrollado diferentes estrategias para evitar ser atacados por LAP. Entre estos patógenos se encuentran bacterias, hongos y parásitos. LAP se desencadena por las diferentes partículas que son reconocidas por el receptor extracelular. Estos patógenos representan una amenaza para la homeostasis. LAP cuenta con receptores de reconocimiento de patógenos (RRPt), como los de tipo TLRs, los cuales están diseñados

para buscar y destruir entidades ajenas. El complejo de TLR1/2/4 es capaz de iniciar LAP en respuesta a los hongos (zymosan, *Aspergillus fumigatus*) o bacterias (*Legionella dumoffii*, *Mycobacterium tuberculosis*) [125], [131]. En ausencia de LAP, el descontrol de estos patógenos produce el incremento significativo de moléculas proinflamatorias tales como IL-6, e IL-1b, que se incrementan significativamente [131], [152].

### 1.4 La retina de vertebrados

La retina neural de vertebrados es un tejido altamente especializado y sensible a la luz, organizado en capas y estructurado con varios tipos de células integradas en un órgano complejo. Todas las retinas de vertebrados tienen la misma organización laminar básica y función fisiológica. La función y morfología de este tejido está delicadamente organizada para producir la salida visual [153].

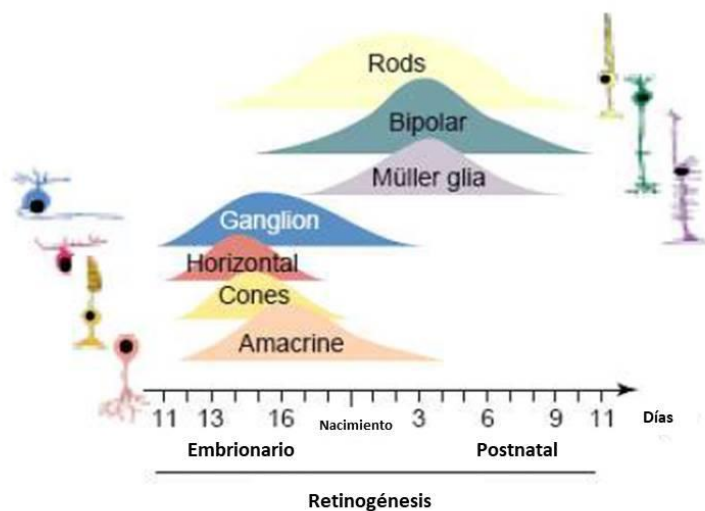
#### 1.4.1 La retina en desarrollo

##### 1.4.1.1 Desarrollo de la retina neural de ratón

El desarrollo del ojo de vertebrados es un proceso complejo regulado por factores intrínsecos y extrínsecos que especifican un área del prosencéfalo como el campo ocular y posteriormente produce la retina neural [154], [155]. El desarrollo embrionario del ratón dura aproximadamente 20 días, dependiendo de la estirpe. Como mamífero que es, continúa su maduración a lo largo de las tres primeras semanas postnatales hasta el destete que tiene lugar hacia día postnatal (P) 20.

La neurogénesis de la retina comienza tras el cierre del tubo neural, que tiene lugar aproximadamente hacia día embrionario (E) 8.5. La complejidad estructural y funcional de la retina se origina a partir de un neuroepitelio pseudoestratificado [156]. En esta edad, aparecen las vesículas ópticas que se evaginan lateralmente desde el prosencéfalo, creciendo hacia la superficie del ectodermo, el cual posteriormente forma la copa óptica y las lentes. La copa óptica está constituida por dos capas: el RPE y la neuroretina (NR), que se desarrolla hasta formar la retina madura trilaminada [157]. El desarrollo de la neuroretina comienza a E12.5 y la neurogénesis no finaliza hasta P6.5. Procesos secuenciales de regionalización, proliferación, diferenciación y muerte celular, finamente coordinados y regulados, van a generar la compleja citoarquitectura de la retina, al igual que en el resto del sistema nervioso (SN). Durante las etapas tempranas del desarrollo de la

retina, la capa de neuroblastos externa está constituida principalmente por células progenitoras mitóticas, mientras que las neuronas recién diferenciadas (principalmente células ganglionares y amacrinas) residen en la capa neuroblástica interna. Los distintos tipos celulares de la retina madura se desarrollan a partir de un conjunto común de progenitores multipotentes [157] mediante un proceso dinámico espacio-temporal en el siguiente orden: células ganglionares, células horizontales, conos, células amacrinas durante el desarrollo embrionario, y células bipolares, bastones y glía de Müller durante el desarrollo postnatal [157], [158] (**Figura 1.18**). Así pues, el momento de salida del ciclo celular parece estar estrechamente ligado con la especificación del destino celular [159]–[162].



**Figura 1.18. Esquema de la diferenciación temporal de los distintos tipos celulares de la retina de ratón.** Las células ganglionares, horizontales, conos y amacrinas se diferencian en el estadio embrionario, mientras que bastones, bipolares y glía de Müller en edades postnatales.

#### 1.4.1.2 Muerte celular en el desarrollo embrionario

La muerte celular es fundamental en el proceso de homeostasis durante el desarrollo de los tejidos. El tipo de muerte más abundante durante el desarrollo es la apoptosis, caracterizado por una disminución del tamaño de la célula, la condensación de la cromatina, la fagocitosis y la posterior degradación de los cuerpos apoptóticos tras su reconocimiento por células vecinas (fagocitos no profesionales) o microglía (macrófagos del SNC) [163]. La acumulación de las células apoptóticas, tiene diferentes consecuencias, entre ellas, se puede producir la fragmentación de su membrana plasmática y desencadenar procesos proinflamatorios. La apoptosis es una muerte celular activa que depende de ATP y lleva consigo múltiples procesos para que funcione. La exposición del fosfolípido PS en la



superficie de la membrana externa de la célula apoptótica [164], es uno de los primeros pasos, y es un proceso altamente dependiente de ATP que permite el reconocimiento de las células muertas para su eliminación del tejido [165]. Durante el desarrollo embrionario de la retina, se han caracterizado diferentes fases de muerte celular [158], [166]. En función del estadio de desarrollo en el que tiene lugar, se distinguen tres fases de muerte en la retina: la muerte morfogénica, la muerte neural temprana y la muerte neurotrófica [167]. La **muerte morfogénica** ocurre en estadios iniciales del desarrollo del ojo y de la retina, y en fases tempranas de proliferación en el neuroepitelio retiniano. Se ha sugerido que esta muerte está implicada en la reestructuración de la retina y en facilitar la salida de las fibras ópticas [168]. La **muerte neural temprana** afecta a neuroblastos proliferativos y a las CGR recién diferenciadas [166] y se localiza en la región central de retinas a E13.5-E16.5. En ratón, este tipo de muerte es difícil separar espacio-temporalmente de la muerte morfogénica [169]. Y por último, la **muerte neurotrófica**, donde las CGR diferenciadas maduras son susceptibles de sufrir muerte neurotrófica por falta de factores tróficos en el proceso de sinaptogénesis con sus células diana. Las CGR sufren dos oleadas de muerte neurotrófica consecutivas y parcialmente solapantes en la segunda mitad del desarrollo de la retina [170]. Posteriormente, existe en la mayoría de las especies estudiadas una muerte celular en la capa de fotorreceptores que coincide con la apertura del ojo en el neonato [167].

### 1.4.1.3 *Papel de la microglía en el desarrollo embrionario*

La microglía, la principal población residente de células inmunes innatas en el parénquima neural, es un constituyente clave de las poblaciones gliales en el sistema nervioso central (SNC). En la última década, se ha descubierto que la microglía juega un papel crucial en el SNC que se extiende más allá de los conceptos más tradicionales de defensa inmune a las funciones de desarrollo y homeostasis del SNC [171]. En la retina, la microglia constituye de manera similar una parte prominente de la población glial residente [172]. El origen de la microglia en el SNC [173], ha sido descrito que derivan de progenitores hematopoyéticos primitivos que se originan a partir del saco vitelino. Son células microgliales redondeadas o con forma irregular con lamelipodios finos. Estas células migran activamente por el SNC en desarrollo fagocitando células apoptóticas [174]. Esta microglía ameboide es la precursora de la denominada microglía ramificada (o microglía quiescente), que existe en el adulto y que está formada por células altamente

ramificadas [175], [176]. Un tercer tipo de microglía es la microglía activa, que se origina a partir de la microglía ramificada ante un daño en el SNC maduro [177]. Estas células tempranas, generadas alrededor de E8 en el ratón, diferencian bajo el control de los factores de transcripción Pu.1 e Irf8. En su entrada al desarrollo de la retina, la colonización y diseminación de la microglía en múltiples especies, incluido el ratón [178], siguen un patrón general similar. Las células ameboides inmunopositivas para los marcadores de microglia/macrófagos emergen primero en el vítreo y en la superficie vítrea de la retina embrionaria alrededor de E11.5 en el ratón, cerca del nervio óptico y en la retina periférica [178]. Estas células migran en el plano horizontal/tangencial en las direcciones central a periférica y circunferencial [179] para ocupar todas las áreas de la retina y luego migrar radialmente desde la capa interna hacia la capa externa de la retina.

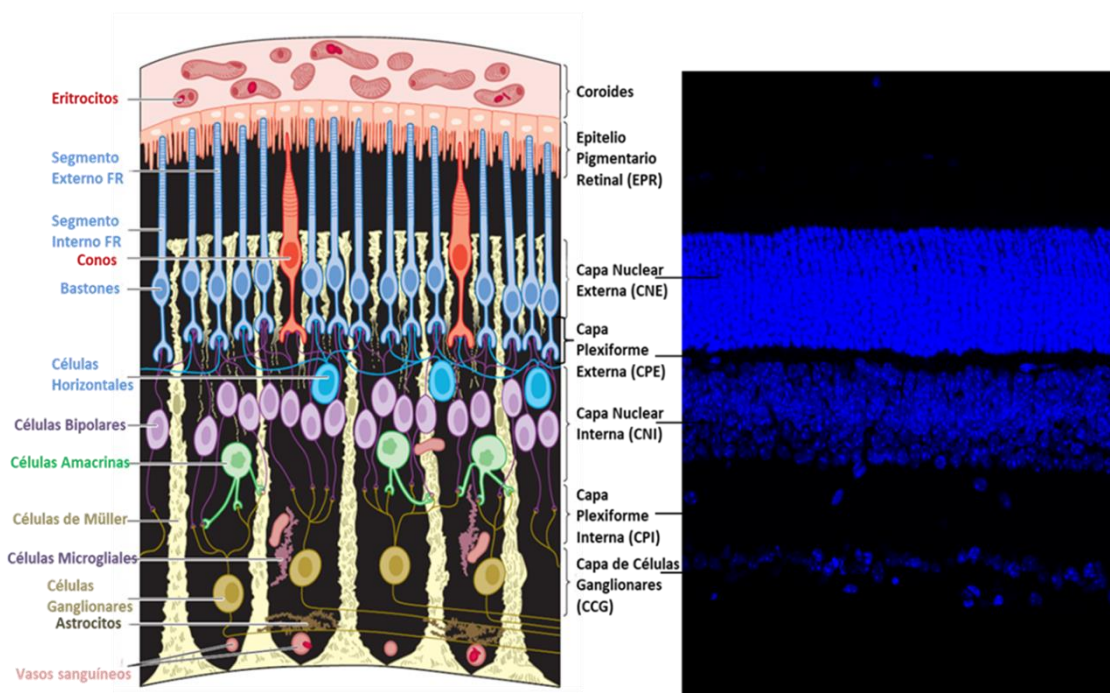
Notablemente, la retina externa, desde la capa nuclear externa (CNE) al RPE, está desprovista de microglia durante todo el desarrollo, designándola como zona de exclusión microglial especializada. En ratón, las células de macrófagos/microglía están ya presentes en retinas de E11.5, fundamentalmente en la región central. En E12.5 incrementan sustancialmente su número y llegan hasta la periferia de la retina. Estas células presentan aspecto ameboide y, frecuentemente, cuerpos apoptóticos en su citoplasma. Evolucionan y se ramifican ya en E13.5 y, entre E13.5 y E15.5, se distribuyen por toda la retina. Desde E16.5, cuando la capa de células ganglionares (CCG) se separa de la capa plexiforme interna (CPI), comienzan a aparecer macrófagos/microglía en esta capa. Al final del desarrollo embrionario, las células microgliales se localizan en la CCG, CPI y en la capa de neuroblastos (CNbL) [178]. Tanto en ratón como en otras muchas especies de vertebrados, las células microgliales en el adulto se localizan en la CCG y en la capa nuclear interna (CNI), estando totalmente ausentes en la CNE [180], aunque este patrón varía en el caso de daño o patología retiniana [181].

## **1.4.2 La retina adulta**

### **1.4.2.1 Estructura y función de la retina adulta**

La retina de los vertebrados en adulto está formada por la retina neural que contiene seis tipos de neuronas y la Glía de Müller (GM), y por el RPE, que está formado por células no neurales que contienen gránulos de melanina [182]. Las células de la neurorretina se distribuyen en tres capas nucleares separadas por dos capas plexiformes. Los núcleos de los

fotorreceptores constituyen la CNE; los núcleos de las neuronas bipolares, amacrinas, horizontales, y los de la GM forman la CNI; los núcleos de las células ganglionares se encuentran en la capa nuclear más interna, en la CCG, donde también se encuentra un subgrupo de células amacrinas desplazadas. Sobre la CCG está el otro tipo de célula glial, los astrocitos. La capa plexiforme externa (CPE) es la región de conexión sináptica entre fotorreceptores y células bipolares. La CPI es la región de conexión sináptica entre células bipolares, amacrinas y dendritas de ganglionares (**Figura 1.19**). Además de estos tipos celulares, también hay células de microglía de origen extra-retiniano.



**Figura 1.19.** Representación esquemática de la retina de mamíferos [183] y marcaje de DAPI en criosección de la retina de un ratón C57BL/6 a la edad postnatal de 21 días. Se muestran los diferentes tipos celulares presentes en la neurorretina como fotorreceptores y otros tipos neuronales, la glía de Müller, la microglía, los astrocitos y los vasos sanguíneos. La capa nuclear externa (CNE) está compuesta por los cuerpos celulares de conos y bastones; la capa nuclear interna (CNI) contiene los cuerpos celulares de las neuronas horizontales, bipolares y amacrinas, y de la glía de Müller. La capa de células ganglionares (CCG) contiene las células ganglionares principalmente.

La capa de fotorreceptores está formada por conos, responsables de la visión a alta intensidad lumínica (visión fotópica), y bastones que se encargan de la respuesta en baja intensidad lumínica (visión escotópica) [184]. Los fotorreceptores convierten la señal lumínica en señal bioquímica mediante la cascada de fototransducción [183].

Las células bipolares contactan con los fotorreceptores y con las células ganglionares, transfiriendo la información de una capa a la otra. Las células horizontales,

que contactan con los fotorreceptores en la CPE, y las células amacrinas, que contactan con las ganglionares en la CPI, integran y precisan la salida visual de la retina. Las células horizontales están involucradas en la mejora del contraste, mientras que las células amacrinas recogen los estímulos visuales a través de la retroalimentación entre células ganglionares y bipolares. Las células ganglionares son las únicas neuronas de proyección de la retina que emiten sus axones fuera del ojo formando el nervio óptico que conecta con el cerebro. La GM desempeña un papel de soporte y es la encargada del mantenimiento de la homeostasis de la retina [182].

#### **1.4.2.2 Degeneración de fotorreceptores y tipos de muerte**

Los fotorreceptores son células bajo estrés constante debido a su alta actividad metabólica al recibir la luz. La teoría actual es que la apoptosis es la muerte celular más común durante el desarrollo retiniano [185], mientras que otros tipos de muerte celular programada han sido descritos en procesos patológicos retinianos. Se ha descrito que el tipo de muerte celular en la degeneración de la retina depende de la disponibilidad de energía. Por ejemplo, si hay un agotamiento de ATP, la necrosis puede activarse. El daño inducido por la luz a los fotorreceptores activa el mecanismo apoptótico [186]. Pero los eventos que ocurren en las degeneraciones retinianas heredadas presentan características alternativas diferentes a la apoptosis. Curiosamente, se ha observado que en la mayoría de los casos, la neurodegeneración de la retina es causada en primer lugar por la degeneración de los bastones seguida de la de los conos. Este fenómeno se denomina muerte celular secundaria, y se ha observado, por ejemplo, cuando los bastones presentan una mutación que induce la muerte celular de los fotorreceptores. Adicionalmente, los bastones a punto de morir, pueden liberar compuestos tóxicos al medio ambiente.

Varias vías se han caracterizado durante la muerte de fotorreceptores:

1. **Influjo de calcio.** El influjo excesivo de calcio ha sido descrito como uno de los principales factores en la degeneración de los fotorreceptores. El calcio activa varias proteínas como las calpaínas en los fotorreceptores de modelos como rd1 [187] y rd10 [188]. Por otro lado, el calcio causa el agotamiento de ATP al activar los mecanismos de eliminación de calcio como las ATPasas, requeridas para llevar el sodio al exterior [189]. Además, el influjo de calcio puede promover el estrés del RE, el cual está muy relacionado con la muerte celular.

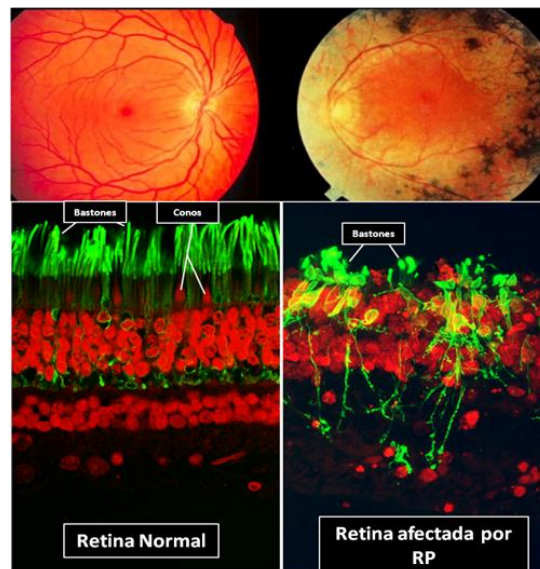
2. **Señalización de nucleótidos cíclicos.** Los nucleótidos cíclicos pueden ser adenosín monofosfato cíclico (cAMP) y guanosín monofosfato cíclico (GMPc). Estas dos moléculas regulan la señalización intracelular. Por ejemplo, se ha demostrado que cGMP puede inducir la muerte de células [190]. Varias mutaciones en modelos de ratón involucran el metabolismo de GMPc, que conduce a la degeneración de la retina. Por ejemplo, entre las mutaciones que afectan a la hidrólisis de cGMP se ha encontrado la de fosfodiesterasa 6 (PDE6) en el 10% de los casos de retinitis humana. Las patologías retinianas hereditarias presentan enormes cambios en transcripción génica, que implica la expresión de este gen bien en la supervivencia o muerte celular.
3. **Activación de las calpaínas.** Las calpaínas son proteínas activadas por calcio con 14 isoformas y están implicadas en la muerte de células. Estas proteínas pueden ser bloqueadas por el inhibidor específico calpastatina. La inhibición de calpastatina con calcio conduce a su autoescisión, lo que lleva a la activación de calpains. En la retina, la inhibición farmacológica de las calpaínas puede bloquear la muerte celular [191]. De hecho, la función de las calpaínas aún no se conoce bien debido a la gran cantidad de sustratos potenciales. Uno de ese sustrato es la arrestina, un componente de la cascada de fototransducción, el cual media la interacción entre rodopsina y transducina [192]. Además, se ha demostrado una mayor actividad de la catepsina en el modelo rd1 [193]. Hay otros factores que afectan a la muerte celular de los fotorreceptores como el estrés oxidativo o fragmentación del DNA.

### 1.4.2.3 Distrofias retinianas: Retinosis Pigmentaria (RP) y modelos

La retinosis pigmentaria (RP) es un grupo de enfermedades degenerativas de la retina caracterizadas por la degeneración de los bastones seguida de la de los conos [194]. El fenotipo clínico de esta enfermedad es la acumulación de pigmento, ceguera nocturna progresiva y visión en túnel, avanzando hasta la pérdida de visión completa [195] (**Figura 1.20**). Esta enfermedad afecta a una de cada 3.500 personas. Entre los más de 250 genes asociados a la enfermedad están las subunidades *Pde6a* y *Pde6b* de la holoenzima PDE6 que dan lugar a formas recesivas de la enfermedad [196]. La PDE6 hidroliza el GMPc a 5'-GMP (guanosín monofosfato) en la cascada de fototransducción. Se ha postulado que mutaciones en esta enzima darían lugar a una acumulación de GMPc. Esto se traduciría en

un aumento de la conductancia a través de los canales de cationes dependientes de GMPc, aumentaría la afluencia masiva de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , causando una sobrecarga metabólica y una elevada toxicidad [195], lo que conduciría a la muerte de los fotorreceptores.

**Figura 1.20. Comparación de la retina normal y la retina afectada por RP.** Se muestra la acumulación de pigmentario en la retina afectada por RP así como la desorganización estructural retiniana que se produce a consecuencia de la enfermedad con la progresiva pérdida de fotorreceptores.



El **ratón *rd10***, es uno de los modelos genéticos más utilizados de esta enfermedad. Presenta una mutación de cambio de sentido (R560C) en el exón 13 del gen *Pde6b* [197], dando lugar a una proteína hipofuncional [198].

El examen histológico de la retina del ratón *rd10* revela la muerte progresiva de los fotorreceptores comenzando en la edad de P16 en la retina central y a P20 en la periférica. El pico de muerte de los fotorreceptores es aproximadamente a P25, quedando una sola fila de fotorreceptores a P35 mientras que la retina silvestre tiene 12 [199]. El resto de capas de la retina se ven afectadas más tardíamente y secundariamente a la pérdida de fotorreceptores [198].

La **N-metil-N-nitrosourea (MNU)**, es un modelo farmacológico que conduce selectivamente a la apoptosis en los fotorreceptores [200] y es ampliamente utilizado como un modelo inducido de RP. En ratones, el tratamiento más común es 60 mg/kg de MNU administrado de manera intraperitoneal en una solución de ácido acético al 0,05% [201]. Respecto a su mecanismo molecular, se sabe que causa estrés oxidativo que aumenta las especies oxidativas como  $\text{H}_2\text{O}_2$  o ROS. Como respuesta, se activan mecanismos antioxidantes como las enzimas HO-1, nNOS o cNOS [202]. Además, se sabe que el MNU induce la acumulación de iones  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la célula, lo que resulta que activa la



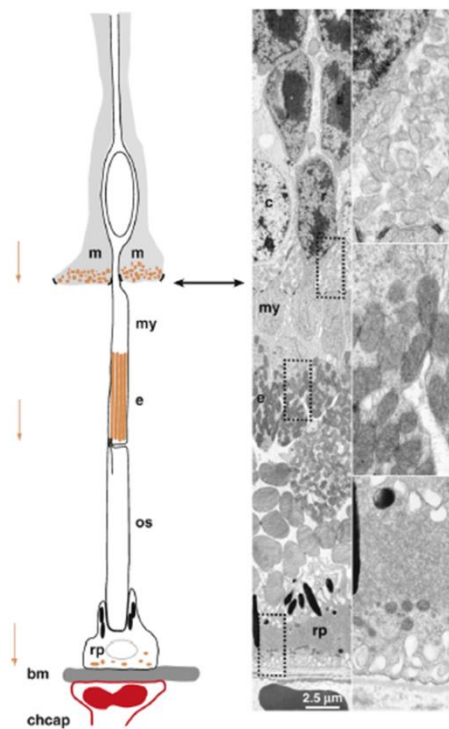
calpaína-2 y conduce a la apoptosis [203]. Por lo tanto, parece que los mecanismos antioxidantes no son suficientes para evitar el daño oxidativo causado por el MNU. No se conoce el enlace molecular directo entre el estrés oxidativo y la inducción de la apoptosis, aunque hay fuertes evidencias de ambos efectos. El efecto selectivo del MNU a los fotorreceptores podría deberse a que los fotorreceptores tienen mayores demandas de energía.

Con respecto al fenotipo retiniano del MNU, se sabe que hay una disminución progresiva en la relación ONL/INL. Este daño se incrementó desde la región retiniana central a la periférica y desde el hemisferio inferior al superior. Además, los explantes de retina mostraron la siguiente distribución ST> SN> IT> IN (Superior-Inferior; Temporal-Nasal) [202], [204].

Con respecto a los fotorreceptores, los conos son más resistentes al MNU que los bastones [204]. Hay una retracción en las células bipolares y una disminución en las dendritas de los fotorreceptores. Además, la proteína gliofibrilar ácida (GFAP) se vuelve progresivamente activa después del tratamiento con el MNU [201], [202]. También se han reportado anomalías en la vasculatura.

### 1.4.2.4 *Mitocondrias y mitofagia en fotorreceptores*

Los fotorreceptores de mamíferos adultos son células alargadas, y sus mitocondrias se encuentran en los extremos de la célula, tanto en los segmentos internos (SI) como en localizaciones terminales del axón, en la capa plexiforme exterior [205] (**Figura 1.21**). También se encuentra una gran concentración de mitocondrias en las conexiones de las células de Müller así como en el RPE.



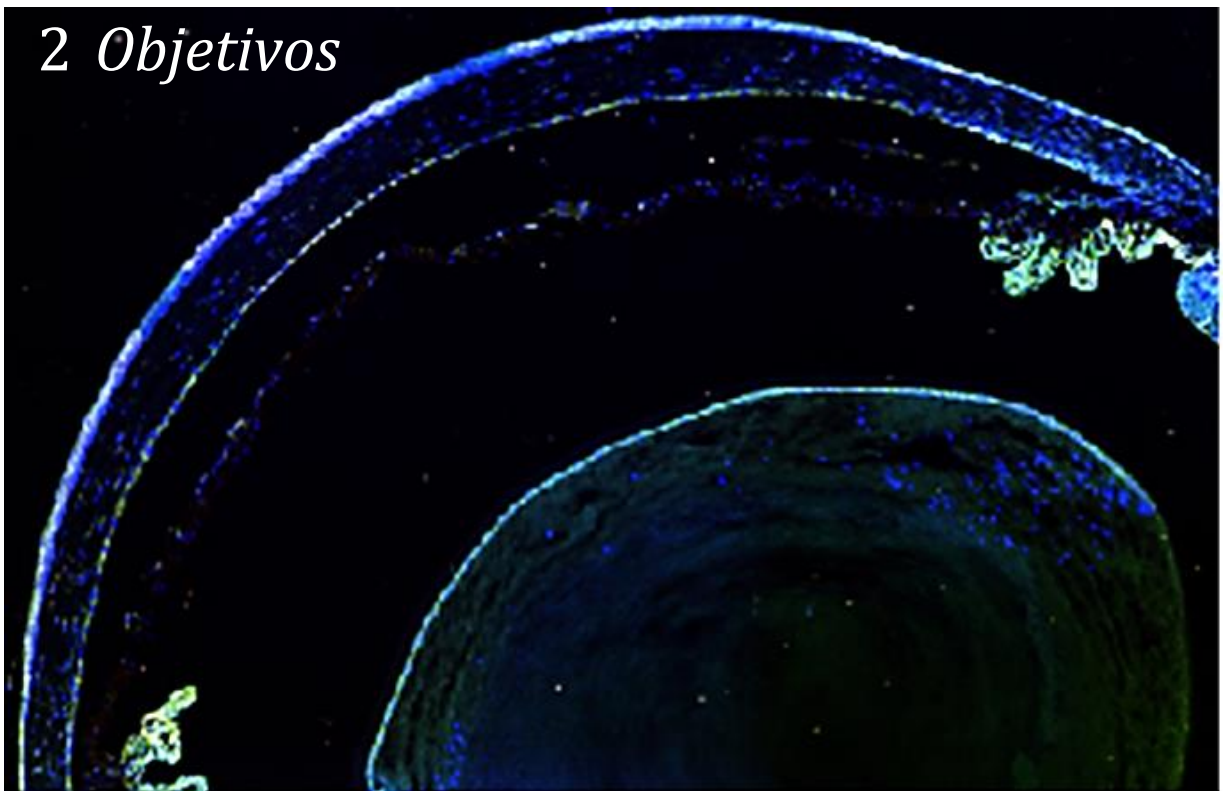
**Figura 1.21.** Se muestra la ubicación de las mitocondrias en las capas externas de la retina de mamíferos adultos. Las mitocondrias se muestran en naranja. En las conexiones de células de Müller (m), los fotorreceptores y las células RPE (rp) se concentran las mitocondrias en el extremo externo de la célula (flechas naranjas); es decir, contra la OLM, contra el cilio de los fotorreceptores y contra la superficie basal de las células RPE. También se observa concentración de mitocondrias en el elipsoide externo (e) del segmento interno; la parte mioide interna (m) del segmento interno está en gran parte libre de mitocondrias. El panel EM a la derecha muestra el aspecto de estas capas de retina. Los 3 rectángulos encierran (desde arriba) el extremo externo de una célula de Müller, segmentos internos de fotorreceptores y una célula de RPE [205].

Como ya hemos descrito anteriormente, las mitocondrias son orgánulos intracelulares cruciales y ubicuos y la principal fuente para la producción de energía celular a través de la fosforilación oxidativa, lo que proporciona la mayoría de los requisitos de ATP de las células eucarióticas [206]. Los fotorreceptores se encuentran bajo constantes cambios ambientales, lo que los hace altamente propensos al estrés oxidativo y nitrosativo (es decir, especies de nitrógeno reactivo), que son los principales contribuyentes de las distrofias fotorreceptoras. Además de estos riesgos, la alta tasa metabólica de los fotorreceptores es un desafío intrínseco para el estrés oxidativo porque ROS es un subproducto importante del metabolismo mitocondrial [207]. En RP, [208] se ha descrito la apoptosis inducida por mitocondrias en los fotorreceptores de bastones en un modelo de rata de RP autosómico dominante caracterizado por una mutación P23H en la rodopsina. También en otros estudios experimentales de RP, la combinación de la producción de ROS por las mitocondrias de los bastones y el aumento de BAX, junto con la modulación descendente de Bcl-2 se cree que inducen muerte de bastones y posteriormente la de los conos [209]. El estrés oxidativo en los conos puede resultar en polarización de la membrana y/o alteración del balance redox de las mitocondrias del cono, que desempeña un papel crucial en la pérdida gradual de la función de este tipo celular [207]. En particular, el envejecimiento de la retina se asocia con un equilibrio deteriorado en la dinámica mitocondrial, especialmente en los segmentos internos del fotorreceptor [210]. El papel de



la mitofagia en la retina se está empezando a estudiar y nosotros planteamos como objetivo principal de esta tesis estudiar la mitofagia en los fotorreceptores, así como su papel ante la degeneración de éstos.

## *2 Objetivos*





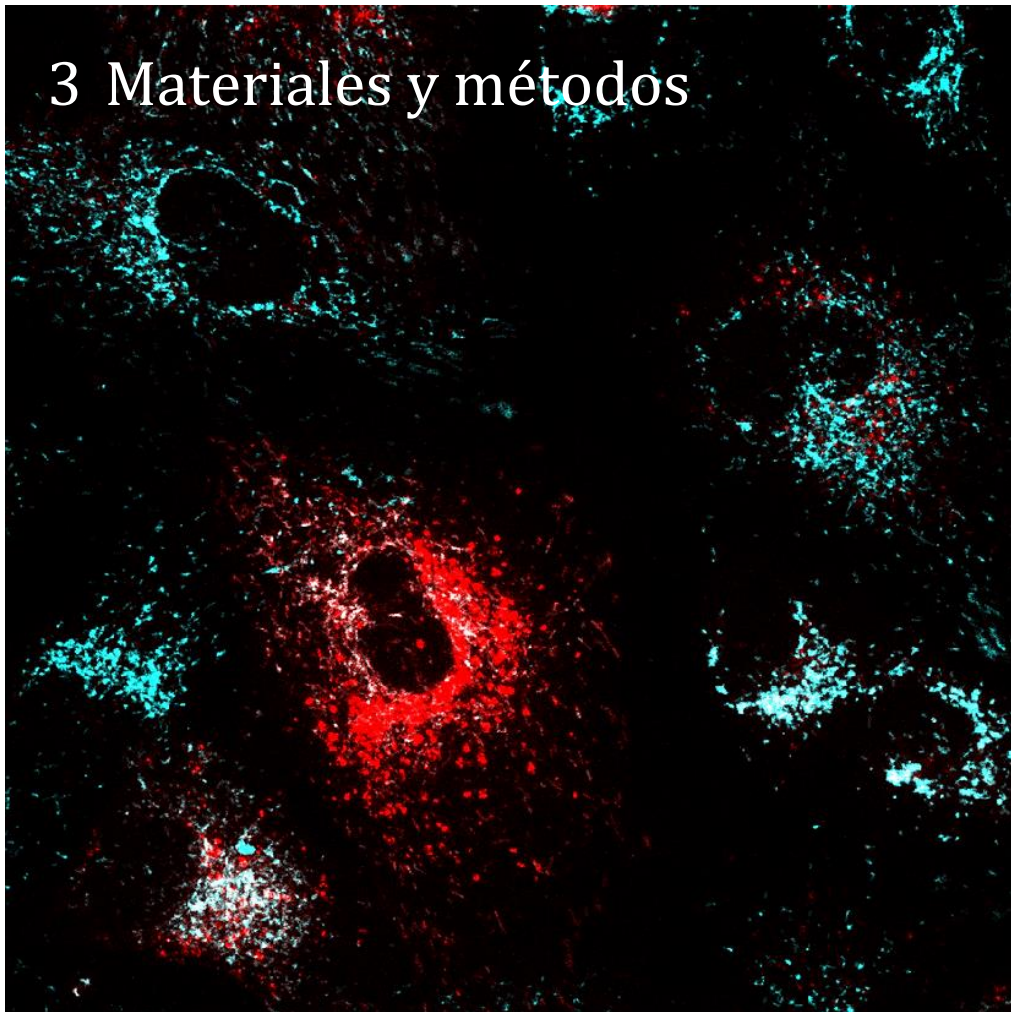
En esta Tesis Doctoral se han planteado dos objetivos principales, cada uno de ellos resultando en dos proyectos diferentes. El primero de los objetivos, ha consistido en entender por qué la mitofagia tiene un papel importante en los fotorreceptores de la retina adulta, en concreto, si la mitofagia tiene un papel neuroprotector ante una degeneración de estas neuronas. El segundo de los objetivos ha sido desarrollar el papel de la autofagia en la eliminación de las células apoptóticas que tienen lugar durante el desarrollo embrionario de la retina.

Los objetivos por proyecto de este trabajo se detallan a continuación:

- 1. Papel de la mitofagia en condiciones fisiológicas y patológicas de la retina de ratón**
  - a.* Optimizar las herramientas para estudiar la mitofagia *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.
  - b.* Comparar los niveles de mitofagia y autofagia en condiciones fisiológicas utilizando los animales Mito-QC y GFP-mCherry-LC3, respectivamente.
  - c.* Estudiar el efecto del N-methyl-N-nitrosourea (MNU) en relación a la mitofagia y muerte celular.
  - d.* Determinar el papel neuroprotector de la mitofagia en la degeneración de los fotorreceptores de la retina.
  
- 2. Papel de la autofagia en los procesos de muerte celular fisiológica asociada al desarrollo embrionario de la retina murina**
  - a.* Estudiar el proceso de fagocitosis en retinas de ratones deficientes de autofagia canónica.
  - b.* Estudiar el proceso de fagocitosis en retinas de ratones deficientes de autofagia no canónica.



### 3 Materiales y métodos





### **3.1 Procedimientos con animales**

#### **3.1.1 Ética y mantenimiento y procesamiento de los animales**

Todos los experimentos y tratamientos de animales se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices de la Unión Europea y la declaración de ARVO para el Uso de Animales en Investigación oftalmológica y de la visión. Además, todos los procedimientos experimentales llevados a cabo con animales en esta Tesis Doctoral fueron aprobados por el Comité de Ética del CSIC y el CIB (Centro de Investigaciones Biológicas), así como de la *School of Life Sciences (University of Dundee)*.

En el animalario del CIB, los animales han sido mantenidos en ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, a una temperatura de 20 °C, suministrándoles comida y bebida *ad libitum*, salvo los que fueron mantenidos en ayuno durante 18 horas para llevar a cabo una inducción de autofagia.

En edades postnatales, se utilizaron hembras y machos indistintamente, y para la extracción de la retina, se ha tenido en cuenta siempre que el procedimiento se realizara a la misma hora para así evitar efectos y variaciones en autofagia debido a los ritmos circadianos [211]. El sacrificio de estos ratones se llevó a cabo mediante dislocación cervical.

En edades embrionarias, se pusieron cruces para la obtención de embriones y el personal del animalario se encargaba de la detección del tapón. La mañana en la que se observaba la presencia de tapón, se estadiaba que los embriones estaban a E0.5. En esta tesis doctoral se han utilizado los embriones a E13.5 y han sido obtenidos mediante dislocación cervical de la madre en estado gestante y posterior cesárea.

#### **3.1.2 Modelos animales**

##### **3.1.2.1 Ratones C57BL/6J y CD1**

Los ratones de fondo genético C57BL/6J y CD1 utilizados en esta tesis, proceden The Jackson Mice Laboratories (Bar Harbor, ME, EE.UU.).

##### **3.1.2.2 Ratones knockout de Atg5**

Los ratones Atg5<sup>-/-</sup> son procedentes del laboratorio del Dr. Noboru Mizushima (Medical and Dental University, Tokyo, Japón) [212]. Se estableció la colonia de estos



ratones en el animalario del CIB mediante transferencia de embriones. Para el mantenimiento de la colonia y obtención de los embriones para los experimentos, se han ido cruzando hembras heterocigotas (+/-) con machos heterocigotos (+/-), de esta forma garantizábamos la obtención tanto de embriones Atg5<sup>-/-</sup> como de Atg5<sup>+/+</sup> como sus controles directos. El genotipo Atg5<sup>-/-</sup> es letal en el momento del nacimiento.

### ***3.1.2.3 Ratones transgénicos mCherry-GFP-FIS1<sup>101-152</sup> (Mito-QC)***

Los ratones transgénicos mCherry-GFP-FIS1<sup>101-152</sup> (Mito-QC) han sido generados en el laboratorio del Dr. Ian Ganley y establecidos en el animalario del CIB mediante transferencia de embriones y estableciendo la línea hasta llevarla a homocigosis. Estos ratones han sido creados a partir de una construcción de DNA generada en células y posteriormente insertada en un locus del ratón como se describe en [123].

cDNA para mCherry, GFP y los aminoácidos 101-152 de la proteína FIS1 de humano, se clonaron en un vector pBABE.hygro. Los ratones Mito-QC fueron creados utilizando este knock-in constitutivo y generado utilizando transgénesis dirigida por TaconicArtemis GmbH. *Recombination-mediated cassette exchange (RMCE)* se utilizó para insertar un promotor de CAG y el marco de lectura abierto para la proteína de fusión mCherry-GFP-FIS1 incluyendo una secuencia Kozak (GCCACC) en el locus *Rosa26* del ratón. El vector RMCE se transfectó en una línea celular TaconicArtemis C57BL/6J ES que contiene sitios de acoplamiento RMCE en el locus *Rosa26*. Los clones recombinantes se aislaron vía selección positiva-negativa (NeoR). Los ratones se mantuvieron en un fondo C57BL/6J.

### ***3.1.2.4 Ratones transgénicos mCherry-GFP-MAP1LC3B***

Los ratones “Autophagy reporter” (mCherry-GFP-MAP1LC3B, denominado mCherry-GFP-LC3) se generaron de la misma manera que mito-QC usando transgénesis dirigida por Taconic Artemis GmbH como se describe en [213], usando en este caso la proteína de fusión mCherry-GFP-LC3.

### ***3.1.2.5 Ratones deficientes del dominio WD de Atg16L1 (LAP<sup>-/-</sup>)***

Como se describe en [214], en primer lugar, generaron el vector. DNA genómico de ratón con cromosoma artificial P1 (PAC) (Source BioScience, 711\_RPCI21mPAC) fue cribado con un fragmento Xho I-Sal I de 0,5 kb obtenido del clon de cDNA de IMAGE

Atg16L1 6,813,377 / AV130 A2 (Fuente BioScience). Un fragmento XhoI de 10 kb y un BamHI de 13 kb que contiene los exones 1–10 de Atg16l1, se subclonó en pBSIISK- (Agilent, 212,206). Dos codones de parada y los sitios de restricción para NheI, XhoI, EcoRV y EcoRI fueron introducidos en el exón 6 después de la posición de aminoácido 230 por PCR. Mediante diferentes cebadores, generaron un fragmento de 3 kb, que fue clonado en un vector pUC19 cortado con SmaI (Addgene, 50,005). El sitio de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino (bGH-pA; derivado de pPGK-Cre-bpA, Addgene, 11,543) fue clonado en el sitio XhoI, seguido de la clonación del cassette PGK-Neo-frt en EcoRV, un fragmento KpnI-SmaI de cultivos de macrófagos SacI-SmaI de 8,7 kb en una proporción de 10: 1 durante 1,5 h antes de ser reparado. La ubicación de LC3 fue analizada por microscopia de inmunofluorescencia. Las células madre embrionarias se cultivaron y las células R1 (2x10<sup>7</sup>) se electroporaron con 30 µg del vector obtenido. Los clones positivos se expandieron y se volvieron a analizar mediante análisis de transferencia Southern y PCR, y fueron inyectados en blastocistos C57L / B6. Los ratones machos altamente quiméricos se cruzaron con hembras C57LB / 6 para obtener descendencia heterocigótica F1. El casete de neomicina fue eliminado cruzando la descendencia F1 con ratones transgénicos FlpO y los ratones se cruzaron posteriormente en un fondo C57L / B6. El análisis del genotipo se realizó con cebadores CAAATATGCCTTCAGAACTG y GCTGTAGTTCCAATCCCTAA, que da como resultado fragmentos de 290 pb y 640 pb para ratones de tipo salvaje y mutante, respectivamente.

### **3.1.3 Genotipaje de animales**

#### **3.1.3.1 Extracción de DNA de las colas de embrionario y adulto**

Para llevar a cabo el genotipaje de los ratones embrionarios Atg5<sup>-/-</sup> y de los ratones adultos Atg5 y Mito-QC, lo primero que se hizo fue extraer el DNA genómico de las puntas de colas cortadas según la técnica descrita por Miller y colaboradores [215].

En primer lugar, se digirieron enzimáticamente los tejidos, añadiendo 0.5 ml de Salting Out a cada cola (Tris-HCl 40 mM, pH 8.0; EDTA 20 mM; SDS 0.5 % (p/v) y NaCl 200 mM) con 15 µl de Proteinasa K (20 mg/ml) (Sigma, 2308) y se dejaron digiriéndose a 55°C toda la noche. Al día siguiente, se llevó a cabo la precipitación del DNA genómico. Primero, se añadieron 0.25 ml de una solución saturada de NaCl 6M a cada tubo, se les dio un vórtex y se dejaron 10 minutos en hielo. Seguidamente se centrifugaron a 12,000 g a 4°C

durante 5 minutos, y se transfirieron 0.5 ml del sobrenadante, donde está el DNA, a un nuevo tubo. A este volumen se le añadió 1 ml de etanol al 95% y se agitaron los tubos. Tras una centrifugación a 12.000 g se lavaron con etanol al 70 % para eliminar las sales y se dio una última centrifugación para quitar el etanol. El DNA extraído y seco se resuspendió en 50 ul de agua MilliQ estéril.

### 3.1.3.2 Genotipaje de ratones y embriones de la colonia *Atg5*

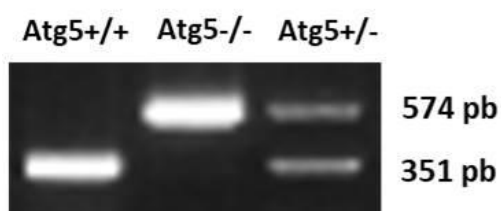
Una vez extraído y resuspendido el DNA, se cuantificó en el Nanodrop y se ajustó a una concentración de 20 ng/ul. Posteriormente se llevó a cabo la PCR (Polymerase Chain Reaction), y para la detección de los diferentes genotipos (*Atg5*<sup>+/+</sup>, *Atg5*<sup>+/-</sup>, *Atg5*<sup>-/-</sup>) se utilizaron 3 cebadores que se describen en la **Tabla 3.1**:

Cebador	Secuencia
<b>Check2</b>	ACA ACG TCG AGC ACA GCT GCG CAA GG
<b>Exon3-1</b>	GAA TAT GAA GGC ACA CCC CTG AAA TG
<b>Short2</b>	GTA CTG CAT AAT GGT TTA ACT CTT GC

**Tabla 3.1.** Cebadores utilizados en la PCR para el genotipaje de los ratones *Atg5* y sus secuencias.

Utilizamos 50 ng de DNA para la PCR, que corresponde a un volumen de 2,5 ul, y lo llevamos a un volumen final de 20 ul. La amplificación se llevó a cabo con el kit Master Mix© (5 PRIME). Para la amplificación se utilizaron las siguientes condiciones: 1 ciclo a 95 °C, 2 minutos; 33 ciclos de: 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 59 °C y 30 segundos a 72 °C; y finalmente 1 ciclo a 72 °C, 10 minutos.

De esta PCR se obtienen dos fragmentos con diferente número de pb (574 y 351 pares de bases) que corresponderán a cada genotipo. Para verlo, se llevó a cabo un gel de electroforesis usando agarosa (Promadisa, 8014) al 2 % (p/v) con 10 ul de Gel Red (BIOTIUM, 41003) en TBE 1X y se corrió a 115V durante 60'. Finalmente se hizo la foto al gel en el GelDoc para analizar los resultados (**Figura 3.1**).



**Figura 3.1.** Foto del gel en GelDoc donde se muestran los diferentes patrones de banda según el genotipaje (*Atg5*<sup>+/+</sup>, *Atg5*<sup>+/-</sup>, *Atg5*<sup>-/-</sup>).

### 3.1.3.3 Genotipaje de ratones de la colonia Mito-QC

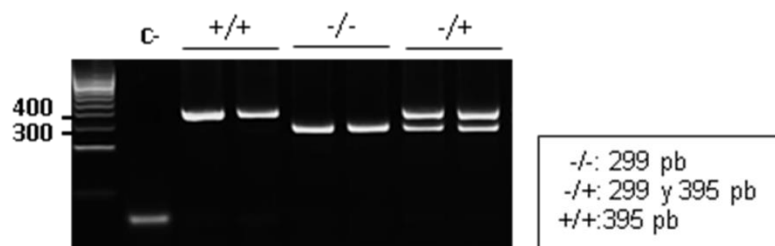
Una vez extraído el DNA genómico según se ha descrito en el apartado 1.1.3.1., se llevó a cabo la PCR. Con esta PCR se amplificó el inserto mCherry-GFP. Por tanto, la homocigosis la veremos con inserto en los dos alelos (+/+), los heterocigotos con inserto en un alelo (-/+), y sin inserto (-/-) en los ratones WT. Se ajustó cada tubo de DNA a 50 ng. Para ello se pusieron 2,5 ul de DNA (20 ng/ ul) en 17,5 ul de Mix. Se utilizaron los siguientes cebadores (Tabla 3.2).

Cebador	Secuencia
<b>7336_5</b>	5' CAA AGA CCC CAA CGA GAA GC 3'
<b>3579_152 (hGH pA 3'1)</b>	5' CCC AAG GCA CAC AAA AAA CC 3'
<b>1114_1</b>	5' CTC TTC CCT CGT GAT CTG CAA CTC C 3'
<b>1114_2</b>	5' CAT GTC TTT AAT CTA CCT CGA TGG 3'

**Tabla 3.2.** Cebadores utilizados en la PCR para el genotipaje de los ratones MitoQC y sus secuencias

Para la amplificación se utilizaron las siguientes condiciones: 1 ciclo a 95 °C, 2 minutos; 28 ciclos de: 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C y 30 segundos a 72 °C; y finalmente 1 ciclo a 72 °C, 10 minutos.

De esta PCR se obtienen dos fragmentos con diferente número de pb (299 y 395 pares de bases) que corresponderán a cada genotipo. Se llevó a cabo la electroforesis como se describe en el apartado anterior, y se obtuvieron geles como el que se muestra en la **Figura 3.2.**



**Figura 3.2.** Foto del gel en GelDoc donde se muestran los diferentes patrones de banda según el genotipaje (Mito-QC<sup>+/+</sup>, Mito-QC Atg5<sup>+/-</sup>, Mito-QCAtg5<sup>-/-</sup>).

### **3.1.4 Inyecciones intraperitoneales de diferentes fármacos**

#### **3.1.4.1 Inyección intraperitoneal y preparación de N-Methyl-N-nitrosourea (MNU)**

N-Methyl-N-nitrosourea (MNU; [202]) fue preparado fresco justo antes del experimento. Se diluyó en suero fisiológico (NaCl 0,9%) filtrado y esterilizado con ácido acético (Merck, 1.00063.1000) al 0,05%. En todos los experimentos se preparó a una concentración aproximada de 12 mg/ml para así inyectar a los ratones un volumen aproximado de 150-200 ul.

Los ratones MitoQC fueron inyectados intraperitonealmente con una única inyección con el compuesto N-Methyl-N-nitrosourea (60mg/kg de ratón) siempre en una edad aproximada de P60. Así mismo, el grupo control de estos ratones fue inyectado con el vehículo (NaCl 0,9-0,05% ácido acético). Estos ratones se trataron durante 24 horas. Los ratones, pasados este tiempo, fueron sacrificados por dislocación cervical, y los ojos fueron extraídos 1.1.5.1. y fijados en paraformaldehído (PFA) al 3.7% (w/v) en tampón HEPES pH 7.0 preparado fresco durante toda la noche a 4°C. Después, en las secciones de estos ojos realizadas como se describe en el apartado 1.1.5.4, se llevó a cabo la reacción de TUNEL (ver apartado 3.1.6.1.) y diferentes inmunofluorescencias (3.1.6.4.).

#### **3.1.4.2 Inyección intraperitoneal y preparación de leupeptina (estudio de flujo de autofagia *in vivo*)**

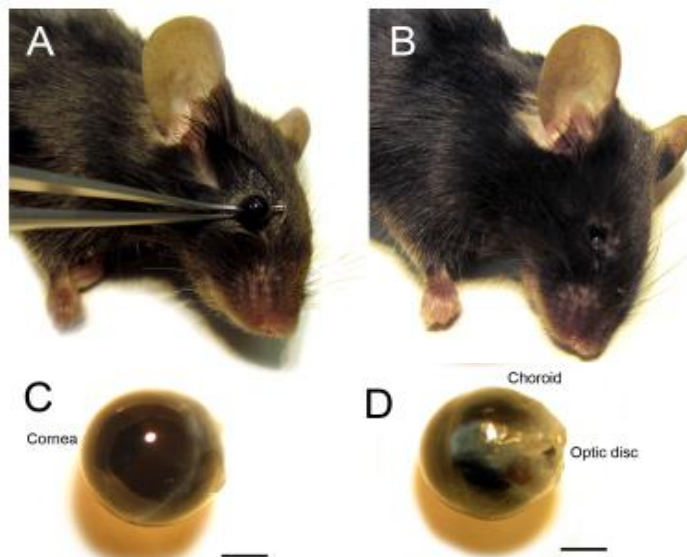
La leupeptina (L2884, Sigma) se preparó fresca antes de realizar las inyecciones, diluyéndola en NaCl 0,9% filtrado y esterilizado. Se preparó a una concentración de 5mg/ml, para así, al igual que en los experimentos con MNU, el volumen de inyección sea en torno a 150-200 ul.

Para el estudio de flujo de autofagia *in vivo*, los ratones fueron mantenidos una noche (18 horas) en ayuno de comida. A la mañana siguiente se les puso de nuevo la comida, y por la tarde, se les sometió de nuevo a ayuno a la vez que se les inyectó leupeptina (40mg/kg) durante 18 horas. Al grupo control se les inyectó vehículo (NaCl 0,9%) en el mismo volumen. Posteriormente, los ojos derechos fueron recogidos para procesamiento histológico de la misma manera que se ha descrito en el apartado 3.1.5.1 y 3.1.5.4. A los ojos izquierdos se les extrajo la retina 3.1.5.2 y fue almacenada a -80°C para técnicas bioquímicas.

### 3.1.5 Procesamiento de muestras

#### 3.1.5.1 Extracción del globo ocular

Para la extracción del ojo, lo primero que hicimos fue sacrificar el animal por dislocación cervical. Posteriormente, se realizó una presión con los dedos alrededor de la órbita ocular para que el ojo saliera hacia fuera y que esto nos permitiera cogerlo con el uso de unas pinzas curvas. Se presionó, se metieron las pinzas curvas por debajo de la esfera, se cerraron en torno a la unión del nervio óptico a la esfera y lentamente se tiró hacia fuera para obtener el ojo lo más limpio posible de músculo (**Figura 3.3**). Posteriormente bien se fijaron o bien se pusieron en PBS1X para la extracción de la retina bajo la lupa como se describe en el apartado 3.1.5.2.

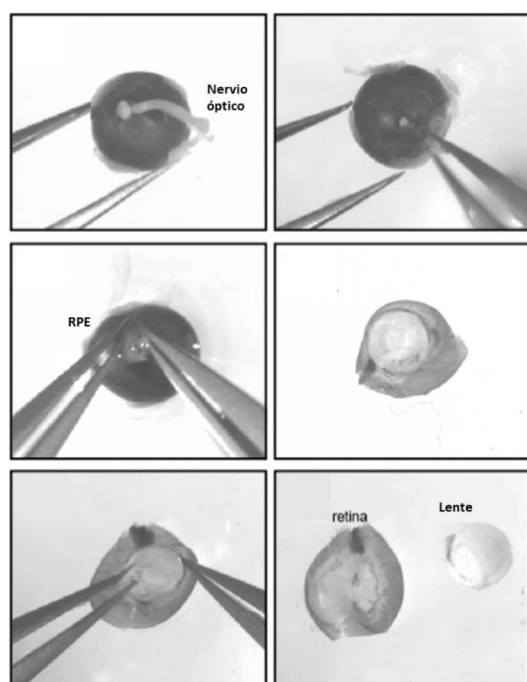


**Figura 3.3.** Enucleación de los ojos de ratón. Tras la enucleación del ojo con unas pinzas curvas (**A-B**), se obtiene el globo ocular, donde se observa que el ojo está completamente intacto y que la córnea y la coroides tienen una apariencia normal (**C-D**). El nervio óptico está contraído en el disco óptico donde sale el ojo [216].

#### 3.1.5.2 Disección de la neuroretina de animales adultos

Después de la extracción del ojo (apartado 1.1.5.1), se puede llevar a cabo la disección de la neuroretina. Los ojos enucleados son depositados en PBS1X. Usando dos pinzas, separamos el nervio óptico del globo ocular, y se metieron las pinzas por el agujero de unión del nervio óptico. Después, se quita el RPE “pelando la retina” y con él, la córnea, y nos quedó el cristalino metido en la retina. Tiramos del cristalino con mucho cuidado y obtenemos la NR (**Figura 3.4**). Las retinas pueden ser fijadas para inmunofluorescencia en PFA 4% en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.14 (si las retinas pertenecen a cualquier cepa de ratón que no sea Mito-QC) o en PFA 3.7% en tampón HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; Gibco, 15630-080) 200 mM pH 7.00 (para cualquier retina

perteneciente a los ratones Mito-QC). Después de la fijación, las retinas fueron lavadas con PBS 3 veces durante 5 minutos cada uno. Finalmente, se guardaron en el frigorífico a 4°C hasta el momento de iniciar la inmunofluorescencia. Para Western Blot o qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*), las neuroretinas fueron congeladas en seco a -80°C hasta la extracción de proteína o de RNA.



**Figura 3.4.** Procedimiento para la extracción de retina adulta. Se muestran los diferentes pasos en la disección de la retina. La separación del nervio óptico del globo ocular, seguido de la eliminación del epitelio pigmentario y finalmente la separación del cristalino (lente) de la neuroretina.

### 3.1.5.3 Cultivo de neuroretinas de ratón adulto

Cuando es extraída la retina, bien se pueden hacer los procedimientos descritos en el apartado 3.1.5.2 o bien pueden ser incubadas en cultivo con diferentes tratamientos. Para cultivo, se realizaron 4 cortes en las retinas para que luego el montaje en plano resultara más fácil. Las neuroretinas fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco, 41966-029) con 1% de glutamina (Gibco, 25030) (2 mM), 1% de Penicilina-Estreptomicina (Gibco, 11568876) (0.5 mg/ml) y 1 uM de insulina (Sigma, I2643) durante 8 horas con diferentes inductores e inhibidores de mitofagia, así como otros agentes. Los tratamientos que se llevaron a cabo y sus concentraciones son descritas en la **Tabla 3.3:**



Reactivos	Casa comercial	Referencia	Concentración	Función
<b>DFP</b>	Sigma	379409	1 mM	Inductor de Mitofagia
<b>CCCP</b>	Sigma	C2750	10 $\mu$ m	Inductor de Mitofagia
<b>MNU</b>	Toronto Research Chemicals	M325815	100 $\mu$ g/ml 500 $\mu$ g/ml 1000 $\mu$ g/ml	Inductor de degeneración en fotorreceptores

**Tabla 3.3.** Listado de reactivos empleados en los cultivos de neuroretinas de ratones adultos.

Al terminar los tratamientos, se lavan las retinas dos veces con PBS1X y son fijadas O/N.

#### **3.1.5.4 Criosecciones de ojo de ratón adulto**

Los ojos de ratón adulto se fijaron durante 24 horas en PFA 4% en tampón fosfato 0.1 M pH 7.14 (si son ojos de cepa de ratón diferente a Mito-QC) o en PFA 3.7% en tampón HEPES 200 mM pH 7.00 (si son ojos pertenecientes a ratones Mito-QC). Después se lavaron 3 veces con PBS y se incluyeron en una solución al 15% de sacarosa en PBS (p/v) hasta que los ojos descendieron al fondo del tubo. Posteriormente los ojos se pasan a una solución al 30% de sacarosa en PBS (p/v) donde se mantuvieron de la misma forma que a 15%, hasta que los ojos descendieron al fondo del tubo. Si los cortes no se iban a realizar seguidamente o en los días próximos, las muestras eran congeladas en Sacarosa 30% a -80°C. Para la generación de los bloques para cortar, fueron embebidos en Tissue Tek OCT Medium (Sakura Finetek, 4583) durante 30 minutos a RT y posteriormente fueron congelados en OCT en hielo seco. Los bloques fueron conservados a -80 °C hasta su utilización. Sobre estas muestras se realizaron cortes de 12  $\mu$ m en un criostato Leica CM 1950 sobre portaobjetos tratados (Superfrost® Plus, Fisher, J1800AMNZ). Las secciones en los portaobjetos se mantuvieron a temperatura ambiente durante una noche para favorecer su adhesión y se mantuvieron a -20 °C hasta el momento de su utilización.

#### **3.1.5.5 Disección de la neuroretina embrionaria**

Tras realizar la cesárea a la madre gestante, el conjunto de sacos vitelinos fue extraído a una placa petri con PBS1X, y los embriones fueron separados de sus respectivos sacos. Estos embriones fueron dispuestos en hielo mientras que se realizaba la extracción de la retina. Para retinas de embriones de E13.5, edad embrionaria que se ha utilizado en esta tesis doctoral, se situó el embrión en una placa de PBS1X bajo la lupa. Con la ayuda de dos pinzas, con una, se sujetó al embrión por la cabeza alrededor de la cavidad del ojo, y



con la otra pinza, con una punta se fue empujando delicadamente el cristalino, ya que a esta edad no hay córnea, por lo que no se tiene que hacer corte. Cuando se consiguió quitar el cristalino, se siguió empujando con cuidado para sacar la retina, y con una pipeta de 200 µl cortada, se cogió la retina y se puso en la placa para ser cultivadas durante 6 horas.

### ***3.1.5.6 Cultivo de neuroretinas de embriones de ratón***

Las retinas embrionarias de ratón fueron cultivadas durante 6h en medio DMEM:HAM/F12 (15.6 mg/ml) (Gibco, 42400-028) suplementado con bicarbonato 1.2 mg/ml (Merk, 1.06329.0500) y piruvato sódico 0.11 mg/ml (Sigma, P5280-100). Después de mezclar estos reactivos, disolvimos con agitación en H<sub>2</sub>O estéril a un volumen inferior al final. Se ajustó el pH a 7.14-7.16 con NaOH 1M. Posteriormente se añadió apotransferrina 0.10 mg/ml (Sigma, T2252-500), selenito 0.0052 mg/ml (Sigma, S5261), putrescina 0.32 mg/l (Sigma, P5780), progesterona 0.2 mg/l (Sigma, P8783) y gentamicina 0.05 g/l (Gibco, 15710). Se enrasó hasta el volumen final y se ajustó a un pH de 7.14. Finalmente se filtró con una torre de filtración de 0.22 µm y se conservó máximo dos semanas a 4°C.

El mismo día del experimento, se suplementó el medio con glutamina a 2 mM e insulina humana (10nM). Aunque, en algunos experimentos, no se añadió insulina a modo de tratamiento. Todos los experimentos de cultivo de retinas embrionarias se llevaron a cabo en placas P24 con 500 µl de volumen de medio por pocillo donde se pusieron cada una de las retinas.

Para la detección de la translocación del fosfolípido fosfatidil-serina (PS) a la superficie externa de la membrana de células apoptóticas se utilizó Anexina-V biotinilada. Se añadió Anexina-V en el medio de cultivo en presencia de 5 % de tampón con calcio y se incubó durante los últimos 30 minutos de cultivo a 37°C en las retinas montadas en plano. Posteriormente las retinas se fijaron en PFA al 4% (p/v) en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 y 2,5 % de tampón de calcio durante al menos 3 horas a 4 °C en placas de 24 pocillos. Posteriormente se montaron (apartado 1.1.5.7) y se procesaron como se describe en el apartado 1.1.6.2 utilizando como anticuerpo secundario una estreptavidina conjugada con el fluoróforo Alexa 568 o 647 (Invitrogen) 1/200 en BGT.

Además, en algunos experimentos, se realizó el marcaje con LysoTracker Red (LTR) durante los 20 últimos minutos del cultivo a 37 °C.

Los tratamientos y marcajes empleados en este estudio se presentan en la **Tabla 3.4**.

Reactivos	Casa comercial	Referencia	Concentración	Modo de acción/Marcaje
<b>P-L-Serina (P-L-Ser)</b>	Sigma	P0878	20 mM	Inhibidor del receptor de PS
<b>Anexina-V biotinilada</b>	Trevigen	4835-01-K	5 %	Translocación de PS
<b>LTR</b>	Invitrogen	L7528	1 $\mu$ M	Orgánulos ácidos

**Tabla 3.4.** Listado de reactivos empleados en los cultivos organotípicos de retinas embrionarias

La P-L-Ser se preparó fresca antes de cada experimento y se suplementó con 1.5 mg/ml de bicarbonato sódico para tamponar la bajada de pH que genera este compuesto.

### 3.1.5.7 Montaje en plano de retinas embrionarias en membrana de nitrocelulosa

Una vez terminado el cultivo, la retina neural se montó en una placa con PBS1X y bajo la lupa sobre una membrana de 0.44  $\mu$ m de poro de nitrocelulosa (Sartorius, 11301--80). Las retinas se colocaron con la capa de células ganglionares hacia arriba, pegando las retinas a la membrana de nitrocelulosa con ayuda de unas pinzas. La adhesión de las retinas a la membrana se hace pinzando la retina por la parte periférica. Posteriormente se fijaron con PFA al 4% (p/v) en tampón fosfato 0.1 M a pH 7.4 O/N a 4 °C.

Al día siguiente se lavaron con PBS1X y bien se inició la inmunofluorescencia, o bien se añadió al PBS1X azida sódica (Sigma, 199931) al 0,001% y se mantuvieron en esta solución a 4 °C hasta el momento del procesamiento.

## 3.1.6 Técnicas de biología celular y molecular en tejido

### 3.1.6.1 Medida de muerte celular por reacción de TUNEL

Para medir la muerte celular, tanto en retinas embrionarias montadas en plano como en cortes de retinas de adulto, se empleó la técnica TUNEL (del inglés, TdT-mediated dUTP Nick End Labelling). Esta reacción consiste en que la enzima transferasa terminal (TdT) añade nucleótidos (dUTP) marcados con fluoresceína a los extremos 3'OH libres del DNA, lo que indica la fragmentación del DNA que se produce durante la muerte celular programada. Para las retinas embrionarias, se utilizó el kit de TUNEL DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega, G3250), con nucleótidos marcados en verde.

Tras la fijación de las retinas embrionarias, se realizaron tres lavados con PBS1X de 5 minutos cada uno. A continuación, se permeabilizaron con Tritón X-100 (Sigma, X100-100ML) al 2% (p/v) en PBS1X durante hora y media (incubando una hora primero, y cambiando el Tritón X-100 al 2% (p/v), dejando otra media hora. Se volvieron a lavar 3 veces durante 5 minutos con PBS1X. Después de esto, se llevó a cabo la reacción de TUNEL. En primer lugar, se incubaron con buffer de TUNEL durante 30 minutos a temperatura ambiente (RT) en cámara húmeda. Pasados estos 30 minutos, se incubaron de igual modo con la mezcla TUNEL que se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante (**Tabla 3.5**).

Reactivo	Concentración
Tampón de TUNEL	88%
dNTPs con FITC	9.8%
Enzima Transferasa Terminal (TdT)	1.9%

**Tabla 3.5.** Listado de reactivos empleados en la técnica TUNEL.

Se aplicó durante 1 hora a 37 °C en oscuridad. Posteriormente, se paró la reacción con PBS1X, y se dieron otros 3 lavados de 5 minutos.

Las membranas de nitrocelulosa con las retinas fueron montadas en portas con una mezcla de glicerol (Calbiochem, 356352) 70% en agua con 4% de 1,4-diazabicyclo-(2,2,2)-octano (DABCO, Sigma, D27802-25G) conteniendo 1µg/mL de 1,4-diamino-2-fenilindol (DAPI; Sigma, D9542).

Esta reacción de TUNEL generalmente ha sido combinada con algún anticuerpo, incubándose el anticuerpo primario antes de la reacción de TUNEL y dejándolo incubar O/N. Al día siguiente se llevaba a cabo la reacción TUNEL y posteriormente la incubación con los anticuerpos secundarios como se describe en el apartado 1.1.6.2.

La reacción de TUNEL en crio secciones de retina adulta, se llevó a cabo con el kit de TUNEL *Click-iT Plus TUNEL Assay* (Invitrogen, C10619). Se utilizó un kit de TUNEL diferente porque los cortes de retina adulta eran de ratones Mito-QC por lo que el marcaje de TUNEL tenía que ser Alexa Fluor® 647. El protocolo para este kit se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante: Se llevó a cabo la preparación de los reactivos (**Tabla 3.6**).

1. Buffer Reaction TUNEL 1X: Se prepara a partir del stock a 10X (Componente D). Se añaden 4.5 ml de agua ionizada a los 500 µl de reactivo.
2. Click it Plus TUNEL Supermix: 2625 µl de 1X Click-iT® Plus TUNEL Reaction Buffer (preparado en paso 1) + 67 µl de Cooper Protectan (Componente F) + 6.7 µl Picolyl azide Alexa Fluor® 647 (Componente G).
3. Click-iT® Plus TUNEL Reaction Buffer Additive 100X (Componente E): Se añaden 2 ml de agua ionizada a los 400 mg de reactivo.

**Tabla 3.6.** Listado de reactivos empleados en la técnica TUNEL Alexa 647

Lo primero que se hizo fue dejar los cortes secando a RT durante unos 30 minutos, y posteriormente, se dieron 3 lavados con PBS1X. Después, se llevó a cabo la permeabilización con Tritón X-100 al 1% (p/v) en PBS1X, realizando 3 lavados de 15 minutos cada uno de ellos. Seguidamente se lavaron 3 veces con PBS1X y se llevó a cabo la reacción TUNEL según instrucciones del fabricante. Se incubaron los portaobjetos durante 10 minutos a 37°C con 50 µl de *TdT Reaction Buffer* (Componente A). Mientras se llevó a cabo la preparación de *TdT reaction mixture*, que para un volumen total de 50 µl por porta, se mezclan 47 µl de *TdT Reaction Buffer*, 1 µl de EdUTP (Componente B) y 2 µl de enzima TdT (Componente C). Se retiran los 50 µl de Componente A y se añaden 50 µl de *TdT reaction mixture* durante 60 minutos incubándolos a 37°C. Pasado esto, se lavaron con PBS1X y se preparó el *10X Click-iT® Plus TUNEL Reaction buffer additive* desde la solución 100X que se preparó en el paso 3, realizando una dilución 1:10 en agua ionizada. Este buffer se utilizó para preparar la solución *Click it Plus TUNEL*, en la que para 50 µl totales por porta, se mezclaron 45 µl de *Click it Plus TUNEL Supermix* preparada en el paso 2 con 5 µl *10X Click-iT® Plus TUNEL Reaction buffer additive* preparada anteriormente. Se añadieron 50 µl por porta, y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se lavaron con PBS1X, se incubaron con DAPI diluido en PBS1X 1 µg/mL durante 10 minutos, se lavaron de nuevo con PBS1X y se montaron con *Vectashield antifade mounting medium* (Vector Laboratories, H-1000-10).

Al igual que en retinas embrionarias montadas en plano, esta reacción puede ser combinada con inmunofluorescencia en el orden que se ha descrito anteriormente y con el protocolo que se describe en el 1.1.6.4.

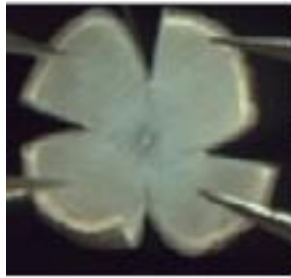
### ***3.1.6.2 Inmunofluorescencia de retinas embrionarias en plano y marcaje con Lectina de Tomate (TL)***

Tras la fijación y los lavados con PBS1X, se procedió a la permeabilización sobre las retinas montadas en plano con Tritón X-100 al 2% (p/v) en PBS1X (primero 1 hora, y luego 30 minutos), y se eliminaron los restos de Tritón X-100 lavando bien con PBS1X y posteriormente se incubó con la solución de bloqueo BGT (BSA (Bovine Serum Albumine; Nzytech, MB014602) 3 mg/mL, glicina (VWR Chemicals, 101196X) a 10 mM y Tritón X-100 al 0.25% en PBS1X) durante 1 hora en cámara húmeda. A continuación, se incubaron las retinas con el anticuerpo primario Iba1 (*Allograft Inflammatory Factor 1*) (Wako, 019-19741) (Conejo, 1:100) en cámara húmeda a 4 °C O/N en la solución de bloqueo. Si se llevó a cabo junto con la tinción de Lectina de Tomate (TL)-Biotina (Sigma, L0651) (1:200), se incubó durante 2h a 37 °C en BGT para detectar la microglía. (En este momento se llevaría a cabo la reacción de TUNEL, si la hubiese, descrita en el apartado 1.1.6.1). La incubación con los correspondientes anticuerpos secundarios anti IgG de conejo o estreptavidina conjugados con Alexa 647 o 568 respectivamente (Invitrogen, 1:200; 1:400) se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente, en cámara húmeda y oscuridad, también en solución de bloqueo (BGT). Tras los correspondientes lavados con PBS, las retinas se montaron con una mezcla de glicerol 70% en agua con 4% de DABCO conteniendo 1 µg/mL DAPI para marcar los núcleos.

### ***3.1.6.3 Inmunofluorescencia de retinas adultas en plano***

Una vez fijadas las retinas tras el cultivo, las retinas se lavaron con PBS1X y se pasaron a tubos eppendorf de 2 mL donde se llevó a cabo la inmunofluorescencia. En primer lugar, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 2% (p/v) (4 veces, 20 minutos cada vez) y se lavaron de nuevo con PBS1X. Posteriormente se bloquearon con tampón BGT y se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo primario *Cone Arrestin* (Millipore, AB15282) (1:500) en cámara húmeda a 4 °C toda la noche en la solución de bloqueo BGT. Tras sucesivos lavados con PBS, se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario anti-rabbit conjugado con el fluoróforo Alexa 647 (1:1000) durante una hora a temperatura ambiente en cámara húmeda, también en solución de bloqueo. Tras los correspondientes lavados con PBS, las retinas se tiñieron con DAPI (1 µg/mL) durante 10 minutos, se lavaron con PBS1X y se montaron con Vectashield (Vector laboratories (Palex medical),

H-1000-10) entre dos cubresobjetos (Fisher, 13226788) bajo la lupa y con la ayuda de dos pinzas finas de disección para estirar la retina como se observa en la **figura 3.5**. Se montaron entre dos cubreobjetos para permitir observar y coger fotos en el microscopio tanto por el lado de los fotorreceptores como por el lado de las células ganglionares.



**Figura 3.5.** Neuroretina extendida con ayuda de dos pinzas finas para posterior montaje entre dos cubreobjetos.

Los cubreobjetos fueron colocados sobre portas y fueron conservados a 4°C hasta su observación al microscopio.

#### ***3.1.6.4 Inmunofluorescencia en criosecciones de retinas adultas***

Los portaobjetos se sacaron de -20 °C y se tuvieron a temperatura ambiente durante 30 minutos para favorecer la adhesión de las muestras al portaobjetos. Tras ello se permeabilizaron los cortes como se describe en el apartado 3.1.6.1. y se incuban con los anticuerpos primarios y secundarios tal y como se ha descrito en el apartado anterior. Para finalizar, se montaron en medio de montaje como se ha descrito también en el apartado 3.1.6.1. Los anticuerpos primarios se muestran en la **Tabla 3.7**.

Anticuerpo	Casa comercial	Referencia	Especie	Dilución	Marcaje
Cone Arrestin	Millipore	AB15282	Rabbit	1:500	Conos
Visual Arrestin	Santa Cruz	sc-166383	Mouse	1:200	Bastones
PKC $\alpha$	Sigma	P4334	Rabbit	1:200	Células bipolares
Calbindina	Sigma	C2724	Rabbit	1:100	Células horizontales y células amacrinas
$\gamma$ -sinucleína	Abnova	H00006623-M01	Mouse	1:100	Células ganglionares
Glutamina sintetasa (GS)	Millipore	MAB302	Mouse	1:200	Glía de Müller
Iba1	Wako	019-19741	Rabbit	1:200	Microglía
GFAP	DAKO	Z0334	Rabbit	1:500	Glia de Müller y astrocitos
TOMM20	Santa Cruz	sc-11415	Rabbit	1:200	Mitocondrias
COXIV	Invitrogen	459600	Mouse	1:200	Mitocondrias
LAMP1	DSHB	AB5218	Rat	1:200	Lisosomas

**Tabla 3.7.** Listado de anticuerpos empleados en la técnica de inmunofluorescencia de retinas adultas en crio secciones.

Para la incubación con los correspondientes anticuerpos secundarios se utilizaron anti IgG de ratón, de rata o de conejo conjugados con Alexa 488, 568 o 647 a la mitad de concentración que su anticuerpo primario correspondiente (Invitrogen).

### **3.1.6.5 Determinación de los niveles de masa mitocondrial por citometría de flujo en retinas de animales adultos**

Retinas de ratones C57BL/6 de aproximadamente 2 meses fueron extraídas como se describe en el apartado 3.1.5.2 y puestas en cultivo durante 6 horas con diferentes inductores de autofagia y mitofagia que se describen en la **Tabla 3.8**. Una vez finalizado el cultivo, las retinas fueron incubadas con tripsina 0.5 mg/ml (Worthington, 3703) diluida en medio Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, ThermoFisher, 14170088) durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente, se disociaron las retinas gentilmente con una pipeta de 1 ml aproximadamente unas 10-12 veces. El efecto de la tripsina fue parado añadiendo 10% (v/v) de Fetal Bovine Serum (FBS, ThermoFisher, 12657011). Seguidamente se añadió DNAsa (5 mg/ml) (Invitrogen, 18068-015) y se dejó actuar durante un minuto a 37°C. Se centrifugaron las muestras a 1200 rpm (revoluciones por minuto), durante 5 minutos, a temperatura ambiente, y se descartaron los sobrenadantes. Por último, el extracto de retina fue incubado con 10 nM de MitoTracker Deep Red (MTDR) (Thermo Fisher, M22426) en HBSS durante 15 minutos a 37°C. Tras la incubación se dio un spin para eliminar los restos de sonda y se resuspendió en 300 µl de medio. Al menos 10.000 células de la retina fueron adquiridas en el citómetro de flujo FC500 (Beckman Coulter) y la media de la fluorescencia del canal FL4 de la población de células vivas fue representada.

Reactivos	Casa comercial	Referencia	Concentración	Función
<b>CCCP</b>	Sigma	C2750	10 µM	Inductor de Mitofagia
<b>Rapamicina</b>	Euromedex	R-5000	200 nM	Inductor de Mitofagia
<b>Deferoxamina (DFO)</b>	Sigma	D9533	100 µM	Inductor de Mitofagia

**Tabla 3.8.** Listado de reactivos empleados en la técnica de citometría de flujo de retinas adultas.

### **3.1.7 Técnicas bioquímicas**

#### **3.1.7.1 Medida de los niveles de ATP en retinas embrionarias**

La medición de los niveles de ATP en retinas embrionarias se llevó a cabo utilizando el kit ATP Bioluminiscent Assay Kit HS II (Roche, 11699709001). Se midió en retinas de embriones Atg5<sup>+/+</sup> y Atg5<sup>-/-</sup> a E13.5. Se hicieron pools de 3 retinas, resuspendiendo en un volumen final de 50 µl de la mezcla del buffer de dilución y buffer de lisis del kit. Tras 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se centrifugaron a 10000g durante 1 minuto



a 4 °C y se calentaron durante 10 minutos a 95°C. Se reservaron 10 µL del extracto para la cuantificación de proteína total mediante el kit Pierce BCA Protein Assay Kit (Pierce Thermo Fisher Scientific, 23227) realizando un patrón con BSA de concentración conocida y la longitud de onda fue medida a 540 nm y se midió el ATP correspondiente a una concentración de proteína de 200 ng en 50 µL. La medición de ATP se realizó mediante la reacción lumínica producto de la reacción de la luciferina en presencia de la enzima luciferasa con ATP y O<sub>2</sub>. Para ello se añadió 50 µL de una solución de luciferasa y luciferina del kit. Esta mezcla también fue añadida a 50 µL de concentraciones de ATP conocidas como recta patrón. La lectura de la placa se llevó a cabo mediante un lector de placas Varioskan.

### 3.2 Cultivos de líneas celulares

#### 3.2.1 Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas en esta tesis doctoral han sido la línea celular SH-SY5Y, proveniente de neuroblastoma humano y procedente de *American Type Culture Collection* (ATCC). Las líneas celulares ARPE-19 WT (línea celular del epitelio pigmentario humano), ARPE-19 NIX KO 31, ARPE-19 NIX KO 36 (deficientes en mitofagia dependiente de NIX), líneas con el reportero Mito-QC: ARPE-19 Mito-QC, SH-SY5Y Mito-QC, ARPE-19 MitoQC con Parkin sobreexpresada y MEFs (Mouse Embryonic Fibroblasts) Mito-QC E17.5, todas ellas procedentes, y las transgénicas generadas, en el laboratorio del Dr. Ian Ganley (School of Life Sciences, University of Dundee, Scotland).

La línea celular SH-SY5Y fue cultivada en DMEM suplementado con 10% de FBS, 1% de glutamina (2 mM) y 1% de Penicilina- Estreptomicina (0.5 mg/ml). Las líneas celulares ARPE-19 (WT, NIX KO 31, NIX KO 36, Mito-QC, Mito-QC con Parkin sobreexpresada), y SH-SY5Y Mito-QC fueron cultivadas en medio DMEM:F12 (1:1) con 15% de FBS, 1% de glutamina (2 mM) y 1% de Penicilina- Estreptomicina (0.5 mg/ml). La línea celular MEFs Mito-QC fue mantenida en DMEM con 20% de FBS, 1% de glutamina (2 mM), 1% de Penicilina- Estreptomicina (0.5 mg/ml), 1 mM de Sodium Pyruvate (Gibco, 11530396) y MEM Non-Essential Amino Acids Solution (MEMNEAA) 1x (Gibco, 11140050). Todos los medios de cultivo fueron filtrados con Filtros Stericup de 0,22 µm (Millipore, SCGPU02RE) y las células fueron mantenidas en incubadores a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

La selección de las células con el reportero Mito-QC lleva un antibiótico de selección correspondiente a Hygromicina B (Gibco, 10453982), para seleccionar únicamente las células que han incorporado el reportero. La concentración de uso de la Hygromicina B es dependiente de la línea celular: Para la línea ARPE-19, se usa a 800 µg/ml y para la línea SH-SY5Y se usa a 500 µg/ml.

### ***3.2.1.1 Generación de la línea ARPE-19 Mito-QC Parkin sobreexpresada: Transfección Retroviral***

La generación de esta línea la llevé a cabo en el laboratorio del Dr. Ian Ganley. Ellos llevaron a cabo la generación del plásmido de Parkin mediante el kit NucleoBond, XtraMidi (Cultek, 22740414.50), obteniendo una concentración de DNA de 0.553 µg/µl. Posteriormente se llevó a cabo la transfección retroviral.

#### ***3.2.1.1.1 Producción de partículas retrovirales en línea celular HEK-293FT***

Se sembraron las células un día antes de la transfección, con un pase adecuado para que en el momento del experimento las células estuvieran a una confluencia aproximada del 60%. Dos horas antes de llevar a cabo la transfección se cambió el medio por medio fresco (DMEM, 10% FBS, 1% penicilina/streptomycin y 1% glutamina). La mezcla de plásmidos que se empleó para dicha transferencia se compuso de: plásmido de las proteínas de la envuelta viral (Clontech VSVG), plásmido con las proteínas de replicación viral (Clontech GAG/POL) y plásmido con el DNA de interés (Parkin).

Para una placa de 10 cm<sup>2</sup> con un 60% de confluencia de la línea celular HEK-293FT, se prepararon dos tubos: 1<sup>er</sup> tubo (300 µl Optimem (Fisher, 11058-021), 6 µg pBabe DNA (Retrovirus construct), 3.8 µg Clontech GAG/POL y 2.2 µg Clontech VSVG) y 2<sup>o</sup> tubo (300 µl Optimem y 36 µl Lipofectamine2000 (ThermoFisher, 11668027)).

Se dejaron incubando en la campana de flujo durante 5 minutos, después, ambos tubos se mezclaron, se agitaron generosamente y se incubaron durante 20 minutos. Posteriormente, esta mezcla se añadió a 5 ml de Optimem y se reemplazó el medio de las células HEK-293FT por la mezcla de transfección con Optimem, incubándolas durante 5 horas. Después se volvió a reemplazar por medio fresco de crecimiento incubándolas toda la noche. A la mañana siguiente se vuelve a reemplazar el medio por medio fresco dejándolo 24 horas. 24 horas después de cambiar el medio, el virus se recogió y fue pasado

por un filtro de 0.45µm. Este virus puede ser almacenado a -80°C para una transfección futura o bien ser utilizado directamente.

### **3.2.1.1.2 Infección de línea celular ARPE-19 Mito-QC para obtener una mayor expresión de Parkin**

Al sobrenadante con el retrovirus se le añadió Polybreno (Sigma, TR-1003-G) 10µg/ml y se aplicó a las células ARPE-19 Mito-QC para ser transducidas durante 24 horas. Al día siguiente se quitó el virus y se puso medio fresco dejándolas crecer. Pasado un día, se aplicaron los antibióticos de selección: Hygromicina 800 µg/ml, para la selección del reportero Mito-QC y Puromycina (Thermo, A1113803) 2 µg/ml para la selección de las células que habían incorporado el plásmido de Parkin.

## **3.2.2 Inmunofluorescencia en células y marcaje de DAPI**

### **3.2.2.1 Plaqueo de células sobre cubreobjetos celulares**

Para llevar a cabo inmunofluorescencias en células y diferentes marcajes, dispusimos las células en cubreobjetos circulares. Para ello se dispusieron estos cubreobjetos estériles en placas de cultivos de 24 pocillos y se sembraron en torno a 50.000 células por pocillo. Cuando se plaquearon experimentos, en las células con el reportero Mito-QC, no se añadieron los antibióticos de selección. Se dejaron una noche en el incubador, y al día siguiente se aplicaron los tratamientos de diferente duración, pero siempre parando todos los tratamientos a la vez para que las condiciones y tiempo de cultivo fuera el mismo. Los tratamientos utilizados se describen en la **Tabla 3.9**.

Reactivos	Casa comercial	Referencia	Concentración	Modo de acción
<b>CCCP</b>	Sigma	C2750	10 $\mu$ m	Inductor de Mitofagia
<b>Antimicina A (A)</b>	Sigma	A8674	10 $\mu$ M	Inhibidor del complejo III mitocondrial
<b>Oligomicina (O)</b>	Sigma	O4876	1 $\mu$ M	Inhibidor del complejo I mitocondrial
<b>Hidroxiclороquina (HCQ)</b>	Laboratorios Rubió	880872.4	30 $\mu$ g/mL	Inhibidor de la degradación lisosomal
<b>Ciclosporina A (CsA)</b>	Sigma	30024	5 $\mu$ M	Inhibidor de mitofagia
<b>DFO</b>	Sigma	D9533	1 mM	Inductor de Mitofagia
<b>DFP</b>	Sigma	379409	1 mM	Inductor de Mitofagia
<b>MNU</b>	Toronto Research Chemicals	M325815	100 $\mu$ g/ml 500 $\mu$ g/ml 1000 $\mu$ g/ml	Inductor/Inhibidor de mitofagia

**Tabla 3.9.** Listado de reactivos empleados en los cultivos de líneas celulares.

Cuando pasó el tiempo de tratamiento, se lavaron las células con PBS1X, y se fijaron 30 minutos con PFA 4% en tampón fosfato 0.1 M pH 7.14 (si son células sin reportero Mito-QC) o en PFA 3.7% en tampón HEPES 200 mM pH 7.00 (si son células con reportero Mito-QC). Después se lavaron 3 veces con PBS1X en agitación y se guardaron a 4°C hasta su procesamiento.

### 3.2.2.2 Marcaje de DAPI en líneas celulares Mito-QC

El reportero MitoQC se altera por diferentes factores. Esto quiere decir que el marcaje de GFP o de mCherry se puede ver afectado bajo determinadas condiciones. La temperatura, el pH, la permeabilización y el medio de montaje son cuatro factores clave que pueden disminuir el marcaje real fluorescente.

Para no cometer errores ni en la cuantificación de mitofagia (mCherry positivo) ni en la cantidad total de mitocondrias (colocalización de GFP y mCherry), lo que se llevó a cabo fue un marcaje de las células solamente con DAPI, para evitar pasos de permeabilización y diferentes factores que influyen. Las inmunofluorescencias con anticuerpos se llevaron a cabo en cubreobjetos diferentes a estos como se describe en el apartado 3.2.2.3.

Después de la fijación y posteriores lavados con PBS1X, se tiñieron las células con DAPI 1  $\mu\text{g/mL}$  durante 10 minutos. Se lavaron 3 veces con PBS1X y se montaron sobre portas con *Prolong Gold Antifade mountant* (Thermo, P10144). Se conservaron a 4°C hasta que se observaron y se cogieron fotos al microscopio.

### 3.2.2.3 Inmunofluorescencia en cristales de líneas celulares

Después de fijar las células y haberlas lavado con PBS1X, se llevó a cabo la permeabilización con SDS al 0,1% (v/v) en PBS1X durante 30 minutos para todos los anticuerpos utilizados excepto para el anticuerpo de DNA mitocondrial (Progen, 61014) que se utilizó Tritón x-100 al 0,5% en PBS1X durante el mismo tiempo. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS1X, en el último de ellos se cambió la placa y se procedió a la incubación con los anticuerpos primarios. Se incubaron en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 1 hora, y estos anticuerpos fueron preparados en BGT. Los anticuerpos primarios utilizados y sus concentraciones son mostrados en la **Tabla 3.10**.

Anticuerpo	Casa comercial	Referencia	Especie	Dilución	Marcaje
mtDNA	PROGEN	61014	Mouse	1:50	DNA mitocondrial
Lamp1	DSHB	AB5218	Rat	1:200	Lisosomas
TOMM20	Santa Cruz	sc-11415	Rabbit	1:200	Mitocondrias
$\gamma\text{H2AX}$	Abcam	ab22551	Mouse	1:200	Rotura de hebras dobles de ADN
CatepsinaB	Santa Cruz	SC6490	Rabbit	1:50	CatepsinaB

**Tabla 3.10.** Listado de anticuerpos primarios empleados en la técnica de inmunofluorescencia de líneas celulares

Se dieron de nuevo 3 lavados con PBS1X y se incubó con el anticuerpo secundario preparado en la misma solución que el primario, durante 1 hora, en cámara húmeda, a temperatura ambiente. A los anticuerpos secundarios se les añadió DAPI 1  $\mu\text{g/mL}$  para teñir los núcleos al mismo tiempo. Los anticuerpos secundarios fueron IgG de ratón, de rata o de conejo conjugados con Alexa 488, 568 o 647 a la mitad de concentración que su anticuerpo primario correspondiente. Finalmente, los cristales con células que no contenían el reportero Mito-QC fueron montados con Fluoromont-G (Bionova, 100-01) y las células

Mito-QC fueron montadas con Prolong Gold. Los portaobjetos se almacenaron a 4°C hasta el momento de utilizarlos.

#### **3.2.2.4 Tinción de compartimentos ácidos: Lysotracker**

Al igual que en las retinas embrionarias de ratón, se utilizó el fluoróforo LTR para marcar los compartimentos ácidos de las células. Se utilizó a una concentración 1  $\mu$ M añadiéndolo los últimos 20 minutos de tratamiento. Después de esta incubación, los cubreobjetos fueron fijados durante 30 minutos y los núcleos marcados con DAPI 1  $\mu$ g/mL. Los cristales fueron montados con Fluoromont-G.

#### **3.2.3 Medida de viabilidad celular mediante Cristal Violeta**

Se sembraron 50.000 células por cada pocillo de una placa de 24 el día de antes de tratarlas con MNU. Se hicieron tres tiempos: 6, 18 y 24 horas. Cuando se pararon los tratamientos, se lavaron con PBS1X y se fijaron con PFA 4% en tampón fosfato durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se añadieron por pocillo 500  $\mu$ l de Cristal Violeta (Sigma, C0775) al 0.1% en agua destilada y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente moviéndolo lentamente en el agitador. Pasado este tiempo, se sumergieron las placas en agua destilada, sin aplicar directamente el agua, agitándolas para ir eliminando el exceso de cristal violeta. Posteriormente se dejaron secando boca abajo durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se resuspendieron las células en 10% de acético en agua destilada, durante 30 minutos, agitándose gentilmente en el balancín. Para una siembra inicial de 50.000 células, se resuspendieron en un volumen de acético-H<sub>2</sub>O de 1250  $\mu$ l. Pasado este tiempo, se homogeneizaron bien con una pipeta de 200  $\mu$ l, y se pipetearon 100  $\mu$ l de cada una de las diluciones en una placa de 96 pocillos, haciéndose duplicados de cada uno de los pocillos. Finalmente, se leyeron y se cuantificaron las absorbancias en un lector colorimétrico a 540 nM.

#### **3.2.4 Western Blot en células**

##### **3.2.4.1 Extracción y detección de proteínas en células SH-SY-5Y**

Se sembraron 300.000 células en placas de 6 pocillos el día de antes de aplicar los tratamientos. Después de la incubación con los tratamientos CCCP, AO, HCQ y CsA, con las condiciones descritas en la **Tabla 3.9** durante 3 horas, las proteínas fueron extraídas

usando 200 µl de buffer de lisis. El buffer de lisis que se utilizó, fue preparado en agua destilada con 50 mM de Tris-HCl a pH 6.8, 10% de glicerol (v/v) y 2% de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) (w/v). En el momento de la extracción de proteínas, se añadió a un determinado volumen de este buffer de lisis: inhibidores de proteasas 1x (Sigma, P8783) e inhibidores de fosfatasas (1 mM ortovanadato sódico (Sigma, S6508), 1 mM fluoruro sódico (Sigma, 201154), y 5 mM fosfato sódico (Sigma, 221368)). Las proteínas fueron levantadas con un émbolo de jeringuilla y fueron transferidas a eppendorfs de 1.5 ml. Se calentaron las muestras a 95°C durante 14 minutos, se dio un spin a todas las muestras y se cogieron 5 µl de muestra a otro tubo para la posterior cuantificación de proteína y se guardó todo a -20°C. Para la cuantificación, a los 5 µl de muestra se les añadió 20 µl de agua estéril realizando una dilución 1:5. Para la cuantificación de proteínas se utilizó el kit de BCA realizando un patrón con BSA de concentración conocida y la longitud de onda fue medida a 540 nm.

### ***3.2.4.2 Inmunodetección de proteínas en membrana de células SH-SY5Y: Western blot***

Una vez obtenida la cuantificación de proteínas, se cargaron 20µg del extracto proteico con 10 mM de DTT y 0.005 % de azul de bromofenol en geles Criterion™ TGX Precast Midi Protein gels (BioRad, 567–1124) y se transfirieron a membranas de PVDF (BioRad, 170–4157) activadas previamente durante 2 minutos en metanol 100% (Panreac, 131091.1214), utilizando el sistema de transferencia Trans-Blot Turbo Transfer (BioRad). La transferencia se realizó durante un tiempo total de 14 minutos (7 minutos primero, y luego otros 7 minutos) a 25 V. Después, las membranas fueron activadas con metanol al 100 % durante 2 minutos, y se les aplicó Ponceau, se lavaron con PBS1X Tween20 (BioRad, 170-6531) y fueron bloqueadas con leche al 5% (w/v) en PBS-T durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Después, se lavaron generosamente con PBS-T y se incubaron con los anticuerpos primarios COXIV y TIMM23 (Mouse) (BD BioScience, 611222) (1:1000) en BSA 3 % en PBS-T O/N a 4 °C y en agitación.

Al día siguiente, se lavaron las membranas con PBS-T y fueron incubadas durante 1h a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (1/2000) (Ratón: Thermo Scientific 31430). Las membranas fueron reveladas con el sistema Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, 32106) y fueron

expuestas a películas Curix RP2 Plus film (AGFA). Las películas fueron cuantificadas con el software ImageJ 1.6.0.

### **3.2.4.3 Extracción de proteínas de células ARPE-19**

Se sembraron 600.000 células en placas Petri de 10 cm el día de antes de aplicar los tratamientos de DFP, CCCP y MNU en las condiciones descritas en la **Tabla 3.9**. Los tratamientos fueron aplicados durante un tiempo de 18 horas. Pasado este tiempo se procedió a la extracción de proteínas con el buffer de lisis siguiente: 50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% Glycerol y 0,5% NP40. En el momento del experimento se añadieron: DTT 1mM, inhibidores de fosfatasa 1mM e inhibidores de proteasas 1x. Se lavan las placas con las células con PBS1X y se añaden 75 µl de buffer de lisis. Con una espátula se rompieron las células y se recogieron en tubos de 1.5 ml, dejando primero 10 minutos en hielo y después, otros 10 minutos centrifugando a máxima velocidad. Se recogió el sobrenadante y se procedió a la cuantificación proteica por el método de BCA como se describió en el apartado 1.2.4.1. Se prepararon las muestras para que estuvieran aproximadamente a una concentración de 1-2 µg/µl, diluyendo las muestras según la concentración inicial de cada una de ellas en SDS4x+BME (β-Mercaptoetanol) (1:10) en agua estéril. Se calentaron las muestras durante 3 minutos a 95°C y se guardaron a -20°C hasta el momento que se procedió a la detección de proteínas en membrana.

### **3.2.4.4 Detección de proteínas en membrana de células ARPE-19**

Una vez preparadas las muestras, se cargaron 20 µl en geles comerciales Criterion<sup>TM</sup> TGX Precast Midi Protein gels, dejándolo correr a 150V durante 90 minutos. Posteriormente, se transfirieron a membranas de PVDF activadas previamente durante 5 minutos en metanol 100%, utilizando el sistema de transferencia húmeda, corriéndolo a 100V durante 60 minutos durante 1 hora. Pasado este tiempo, se puso Ponceau para ver las bandas y las membranas fueron lavadas con metanol para quitar el Ponceau. Se lavaron con TBS-T (Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20) y se bloquearon las membranas durante 30 minutos en leche al 5% en TBS-T en agitación a temperatura ambiente. Se lavaron con TBS-T y se incubaron con los anticuerpos primarios (**Tabla 3.11**) preparados en 5% de BSA en TBS-T durante toda la noche a 4°C.



Anticuerpo	Casa comercial	Referencia	Especie	Dilución	Marcaje
PINK1	Novus	BC100-494	Mouse	1:1000	Proteína PINK1
TOMM20	Santa Cruz	sc-11415	Rabbit	1:500	Mitocondrias
COXIV	Invitrogen	459600	Mouse	1:500	Mitocondrias
HSP60	Abcam	ab110312	Mouse	1:500	Mitocondrias
Vinculina	Abcam	ab129002	Rabbit	1:1000	Vinculina

**Tabla 3.11.** Listado de anticuerpos primarios empleados en la técnica de Western Blot de líneas celulares.

Se lavaron las membranas con TBS-T y se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-Rabbit (DAKO, P0448) o anti-Mouse conjugados con peroxidasa durante una hora a temperatura ambiente en 5% de leche en TBS-T. Se lavaron los anticuerpos con TBS-T y las membranas fueron reveladas con el sistema Pierce ECL Western Blotting Substrate en ChemiDoc™ Imaging Systems (BioRad).

### 3.2.5 Medida de los niveles de mitofagia en células: Citometría de Flujo

Se sembraron 75.000 células en una placa de 24 pocillos el día de antes de aplicar los tratamientos. Una vez terminados los tratamientos de AO, CCCP, HCQ y CsA en las condiciones descritas en la **Tabla 3.9** se recogieron las células. Se lavaron con 200 µl de PBS1X y se levantaron con 150 µl de tripsina (Thermo Fisher Scientific) a 37°C durante aproximadamente 5 minutos. La acción de la tripsina fue parada con 450 µl de DMEM conteniendo 10% de FBS y las muestras fueron transferidas a tubos de citometría. Seguidamente, los tubos fueron centrifugados durante 5 minutos a 140g, el sobrenadante se tiró, y se resuspendieron las células en 500 µl de medio fresco. Por último, las muestras fueron incubadas con 10 nM de MTDR durante 15 minutos a 37°C y se midieron Al menos 10.000 células en el citómetro de flujo FC500 (Beckman Coulter) y la media de la fluorescencia del canal FL4 de la población de células vivas fue representada.

### 3.2.6 Microscopía electrónica de transmisión

Se sembraron 300.000 células ARPE-19 por pocillo de una placa de 6 pocillos un día antes de añadir el tratamiento de MNU durante 18 horas. Cuando finalizó el tratamiento, el medio fue retirado y las células se lavaron con PBS1X y fijadas con 3% de

glutaraldehído (v/v) en PBS1X durante una hora. Después de la fijación, las células fueron lavadas con PBS1X y refijadas con osmio al 1% y ferricianura al 0.8% en PBS1X durante una hora. Después de los lavados con PBS1X, las células fueron deshidratadas con lavados de etanol, yendo desde el 30% al 100% gradualmente. Posteriormente, las células fueron infiltradas con resinas epoxy LX 112 y fueron polimerizadas durante 24 horas a 60°C. Seguidamente, se realizó ultramicrotomía y contraste con 5% de acetato de uranilo en PBS1X y citrato de plomo. Finalmente, Las muestras fueron observadas y las fotos se adquirieron con el microscopio electrónico de transmisión 1230 80kv con cámara TVIPS 4KxK.

### **3.3 Adquisición de imágenes con fluorescencia y cuantificación**

Las imágenes tanto de las retinas como de las células fueron adquiridas en el microscopio Leica SP5 (Leica Microsystems GmbH) del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB). Las fotos tomadas durante la estancia en Dundee fueron cogidas con el microscopio Leica SP8 (Leica Microsystems GmbH). Todas las fotos que se muestran en esta tesis doctoral corresponden a la proyección máxima del grosor total de la retina o a secciones obtenidas del total de 1  $\mu\text{m}$ , en el caso de criosecciones de ojo, y de 2  $\mu\text{m}$ , en el caso de las retinas montadas en plano. En cuanto a las células, bien son proyecciones máximas con zoom de 2, o secciones de 0,5  $\mu\text{m}$ .

La cuantificación de las imágenes de retinas embrionarias se llevó a cabo con el programa ImageJ 1.44 p. Utilizando en todas las tinciones el plugin llamado “Cell counter”, aplicándolo sección por sección, nunca en la proyección máxima.

En las fotos de retinas adultas montadas en plano, para tinciones de área cubierta por una determinada proteína, se utilizó en mismo programa generando un macro en el cual se convertían todas las imágenes a 16 bit, se ajustaba un umbral mínimo de detección común para todas las imágenes y la cuantificación se hacía automática.

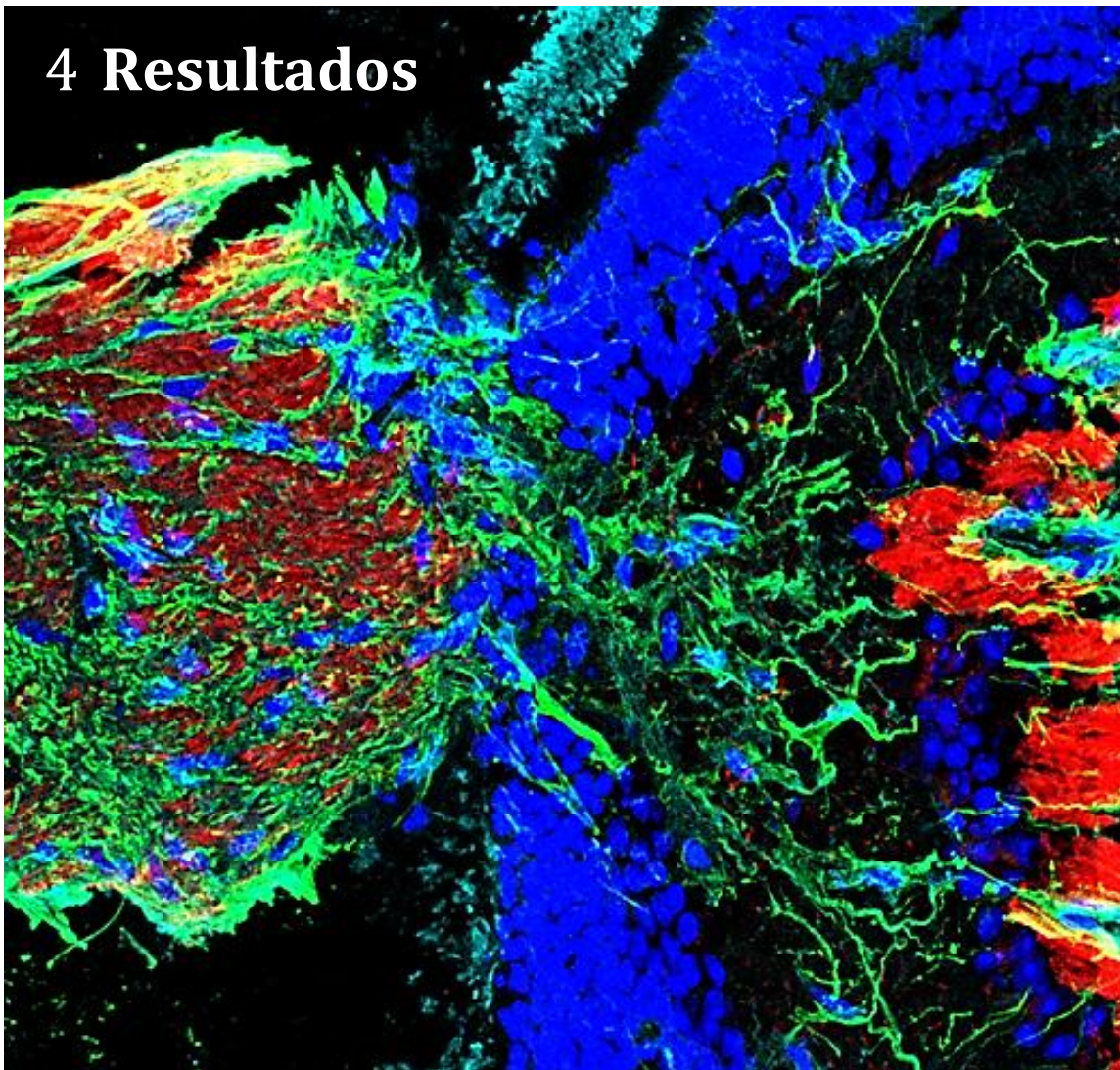
En las fotos de retinas adultas, tanto montadas en planas como criosecciones de ojo, y células, todas ellas con el reportero Mito-QC, se aplicaron tres plugin (uno específico para retinas montadas en plano, otro específico para criosecciones y otro para células) creados por Ignacio Ramírez Pardo, compatibles con el programa ImageJ 1.44 p. Los tres plugin se basan en una medida de colocalización (GFP-mCherry) y en una medida de la población de

mCherry (Mitofagia), seleccionando mediante la herramienta ScatterPlot las poblaciones con los diferentes fluoróforos activos.

### **3.4 Análisis estadístico**

El análisis de datos presentados en este trabajo se realizó con el programa estadístico GraphPad Prism 7. Si se cumplían las predicciones de normalidad y homocedasticidad mediante el test *D'Agostino-Pearson test*, el análisis utilizado para comparar diferentes tratamientos fue el análisis *T-Student* o el análisis de la varianza (ANOVA). Cuando las poblaciones no seguían una distribución normal, se utilizó el test no paramétrico *Mann-Whitney U-test*. La significancia se consideró significativa con una  $p < 0,05$ . Se presentan los datos como la media de cada población  $\pm$  error estándar.

## 4 Resultados





## 4.1 Papel de la autofagia selectiva de mitocondrias en la fisiología-patología del sistema nervioso

El objetivo de esta parte de la tesis doctoral ha sido estudiar el papel de la autofagia selectiva de mitocondrias, la mitofagia en la fisiopatología del sistema nervioso, utilizando la retina murina como modelo. Para ello en primer lugar hemos desarrollado las herramientas necesarias, para su determinación tanto en cultivos celulares, organotípicos como en diferentes modelos animales *in vivo*.

### 4.1.1 Herramientas para el estudio de la mitofagia

Hemos desarrollado una serie de herramientas que nos permitan determinar la mitofagia de una manera robusta, sencilla y cuantitativa. Para ello diferentes técnicas y fármacos han sido optimizados para estudiar distintos mecanismos y funciones de la mitofagia.

#### 4.1.1.1 Herramientas para el estudio *in vitro* de la mitofagia

##### 4.1.1.1.1 Estudio de la mitofagia basal e inducida en células SH-SY5Y mediante citometría de flujo

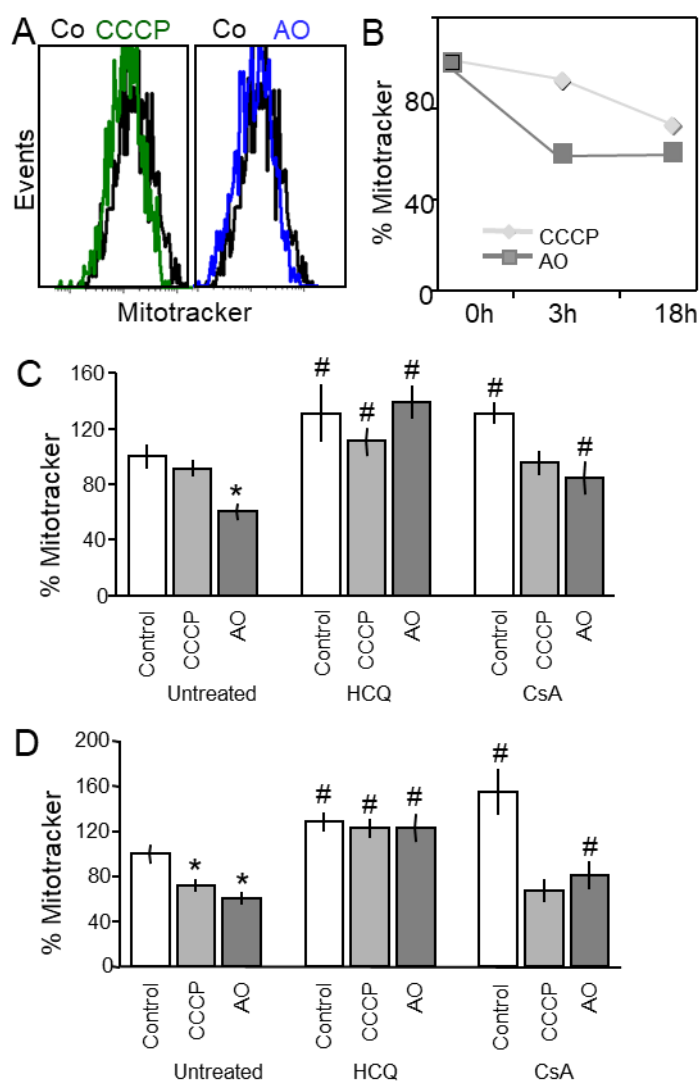
En nuestro laboratorio hemos desarrollado un nuevo método para el estudio de la mitofagia [40]. Se basa en la utilización del MTDR, sonda que tiñe las mitocondrias en células vivas, que se puede analizar por citometría de flujo. Cuando se usa junto con inhibidores lisosomales, proporciona una herramienta novedosa para evaluar el flujo mitofágico, que es el indicador más preciso de si las mitocondrias son llevadas realmente a los lisosomas para su degradación durante la mitofagia.

En mi tesis doctoral hemos querido validar este método utilizando nuevos inductores de mitofagia que no se habían utilizado anteriormente, así como comparar este método con otros existentes en la literatura. La despolarización mitocondrial es la estrategia más común utilizada para inducir la mitofagia *in vitro*. Esto se puede lograr utilizando el desacoplador de la fosforilación oxidativa mitocondrial CCCP (carbonil cianuro *m*-clorofenil hidrazona), que reduce el potencial de membrana mitocondrial, o bloqueando la respiración mitocondrial con una combinación de oligomicina (Inhibidor de la ATP sintetasa) y antimicina A (Inhibidor del complejo III) (AO) [82], [90]. Tratamos la línea

celular de neuroblastoma humano, SH-SY5Y, con estos dos inductores de mitofagia durante períodos cortos (3 h) y largos (18 h) y analizamos los niveles de la sonda mitocondrial MTDR por citometría de flujo (**Figura 4.1**). Para confirmar que una disminución en el marcaje se debe a la degradación autofágica, bloqueamos la degradación lisosomal tratando las células con el inhibidor lisosomal hidroxiclороquina (HCQ), el cual eleva el pH del lisosoma e inhibe la fusión entre autofagosomas y lisosomas, evitando así la maduración de los autofagosomas en autolisosomas, y bloqueando el último paso de la macroautofagia [46]. Por otro lado, prevenimos la mitofagia utilizando la ciclosporina A (CsA), que bloquea el poro de transición de permeabilidad mitocondrial y ha sido utilizado anteriormente para bloquear la mitofagia por nosotros y otros grupos de investigación en diferentes tipos celulares [217]–[221].

En condiciones sin tratamiento, hay una disminución de los niveles de MTDR a tiempo de 3h con AO (**Figura 4.1**), por lo que a tiempos cortos, la AO induce más mitofagia que CCCP. A 18 horas, hay una disminución con ambos inductores respecto al control, lo que nos indicaría que se está dando una inducción de mitofagia. Si nos fijamos en los inhibidores, la HCQ está inhibiendo tanto la mitofagia basal como la mitofagia inducida a ambos tiempos, pero sin embargo, la CsA, está inhibiendo la mitofagia basal y la mitofagia inducida por AO, pero no la que es inducida por CCCP (**Figuras 4.1 b y 4.1 c**).



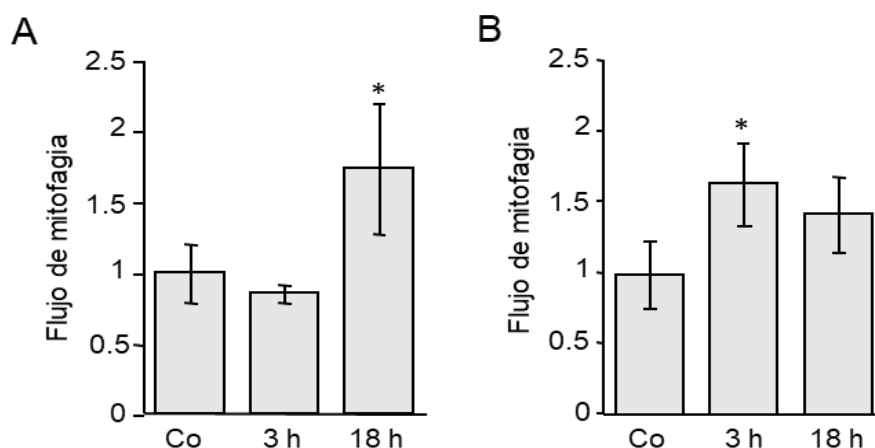


**Figura 4.1. Evaluación de la mitofagia mediante MTDR en células SHSY-5Y por citometría de flujo.** **A.** Histograma representativo de SH-SY5Y células tratadas durante 18 h con AO o CCCP, teñidas con MTDR y analizadas por citometría de flujo. **B.** Disminución de la fluorescencia de MTDR en células tratadas como se describe en (a.), representada como una función del tiempo. **C.** Células tratadas con CCCP y AO durante 3 h **C.** y 18 h **D.** en ausencia o presencia de HCQ y CsA, incubadas con MTDR y analizadas por citometría de flujo. \*  $P < 0.05$  con respecto al grupo de control correspondiente. #  $P < 0.05$  con respecto a grupo correspondiente incubado en ausencia de HCQ o CsA (sin tratar). Test estadístico *T-student*.

#### 4.1.1.1.2 Estudio del flujo de mitofagia

Definimos el flujo mitofágico como la relación de fluorescencia MTDR en presencia de inhibidores lisosomales (HCQ) frente en ausencia de inhibidores, normalizado al valor correspondiente en células control. Como se muestra en la **Figura 4.2**, tanto CCCP como AO muestran un flujo mitofágico, aunque con una cinética distinta.



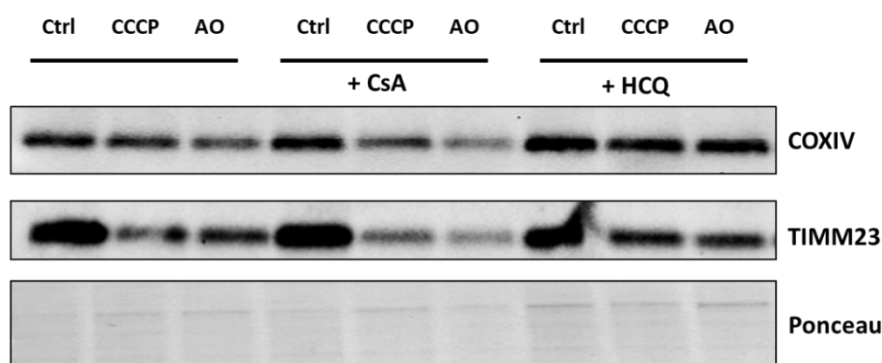


**Figura 4.2. Determinación del flujo mitofágico.** El flujo mitofágico se calcula siguiendo la siguiente fórmula: % vs control (MTDR en presencia de inhibidor / MTDR en ausencia de inhibidor). Flujo mitofágico en células SHSY-5Y tratadas con CCCP (A) o AO (B) en presencia de HCQ. Test estadístico *T-Student*.

Concluimos por tanto que hemos desarrollado y validado un método altamente reproducible para la evaluación de mitofagia utilizando MTDR, ya que nos permite la determinación del flujo mitofágico cuando se usa en combinación con inhibidores de autofagia y mitofagia, permitiéndonos así la comparación directa de diferentes inductores e inhibidores en la evaluación cuantitativa de la mitofagia. La AO tiene un efecto mucho más rápido en el tiempo, mientras que el CCCP actúa de forma más lenta pero llegando a los mismos niveles de actuación. La HCQ en comparación con la CsA, es mucho más constante y efectiva en todos los experimentos.

#### 4.1.1.1.3 Estudio de los niveles mitocondriales mediante Western Blot

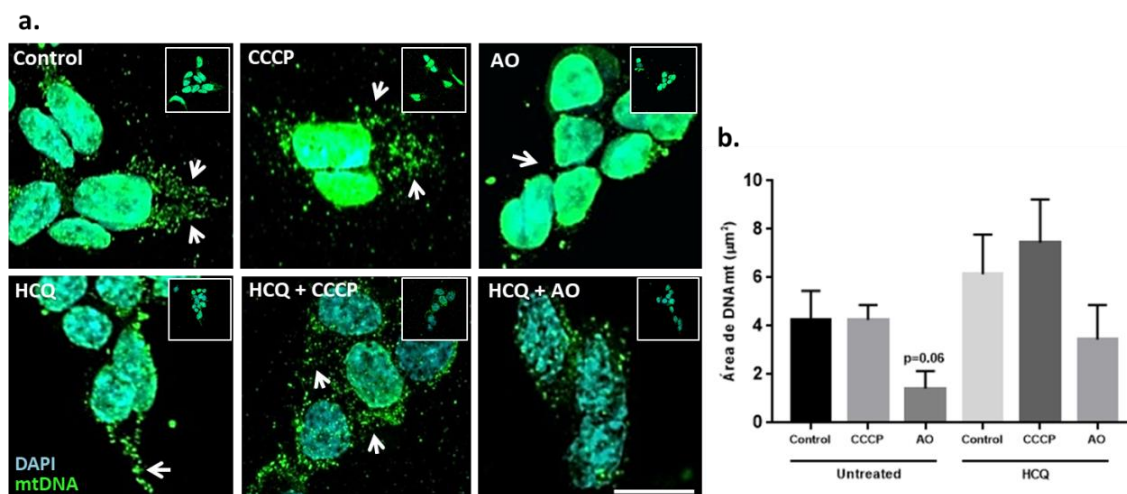
Para apoyar este estudio y ver que las proteínas mitocondriales variaban de la misma manera que variaban los niveles de MTDR con los diferentes inductores e inhibidores, lo que se llevó a cabo fue un Western Blot para identificar estas proteínas. Se trataron las células SH-SY5Y durante 3 horas con los tratamientos de CCCP, AO, CsA y HCQ, estudiando COXIV, proteína de la matriz mitocondrial, y TIMM23, proteína de la membrana mitocondrial, como proteínas mitocondriales (**Figura 4.3**). De nuevo, a 3 horas, la CsA no bloquea la mitofagia inducida, mientras que con la HCQ sí que se observa bloqueo, tanto si observamos la proteína COXIV como la proteína TIMM23.



**Figura 4.3. Western Blot de proteínas mitocondriales.** Se representa la detección de diferentes proteínas mitocondriales presentes en retinas células SH-SY5Y con diferentes tratamientos aplicados durante 3 horas.

#### 4.1.1.1.4 Inmunofluorescencia de marcadores mitocondriales en células SH-SY5Y

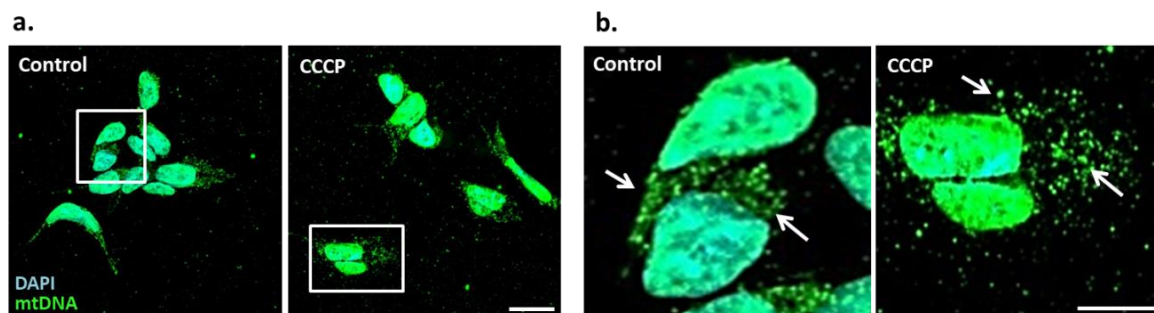
Para determinar si con estos inductores e inhibidores de mitofagia sucedía un cambio de localización o morfología mitocondrial, lo que llevamos a cabo fue una tinción con TOMM20 y DNAmT. La tinción de DNA mitocondrial se ha utilizado por otros autores como una medida de mitofagia [90]. Se trataron las células SH-SY5Y durante 3 horas con CCCP y AO, y se inhibió el flujo mitocondrial con HCQ (**Figura 4.4**).



**Figura 4.4. Inmunofluorescencia de DNA mitocondrial.** a. Inmunofluorescencia de DNAmT (verde) y marcaje de DAPI (cyan) de células SH-SY5Y con diferentes tratamientos durante un tiempo de 3 horas. Proyecciones máximas con zoom de 2 de cada una de las fotos que hay en el recuadro en la zona superior izquierda (63x). b. Cuantificación del área ocupada por mtDNA. Barra de escala de 10 μm. Las flechas indican el punteado de mtDNA. Se muestran las barras SEM. Test estadísticos de *T-Student* y *Mann-Whitney*.

Los resultados obtenidos por inmunofluorescencia apoyan los resultados descritos anteriormente con las diferentes técnicas, viendo que hay una tendencia de descenso de la masa mitocondrial cuando se tratan las células con AO, ya que es más rápido que el CCCP, y una tendencia de bloqueo de la mitofagia tanto basal como inducida cuando se usa HCQ.

Además, podemos observar que el tratamiento con CCCP, aunque a 3 horas no disminuya la masa mitocondrial, redondea las mitocondrias (**Figura 4.5**), no se observa la misma hilera que observamos en las células control. Por lo tanto, el marcaje con anticuerpos para el DNAmT es también un buen método para determinar los niveles de mitofagia.



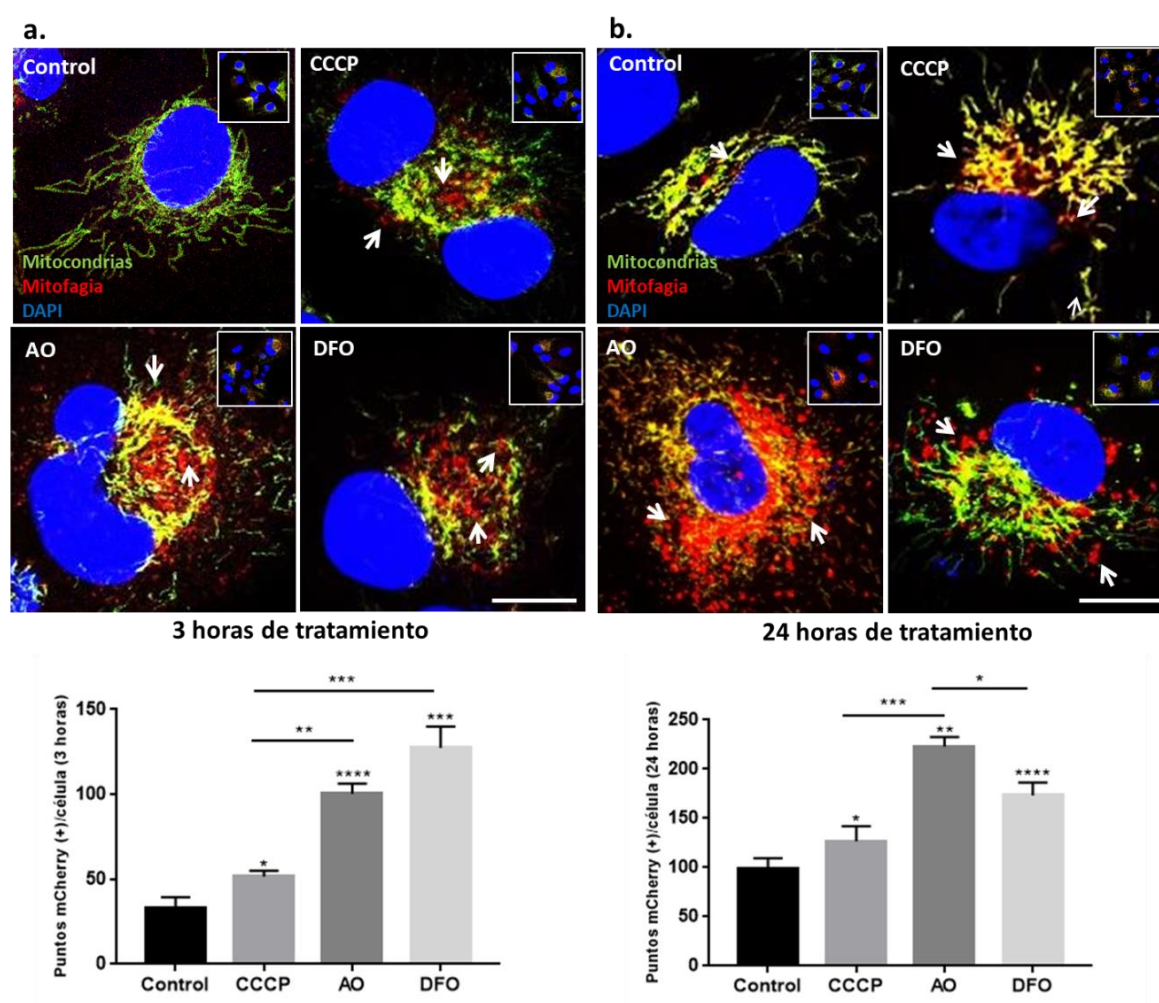
**Figura 4.5.** Las mitocondrias de las células SHSY5Y tratadas con CCCP presentan un aspecto redondeado. **a.** Proyecciones máximas de inmunofluorescencia de DNAmT y marcaje con DAPI de células SH-SY5Y control y tratadas con CCCP durante 3 horas. **b.** Aumento de las imágenes encuadradas en el panel a. Barra de escala de 50 µm. Las flechas indican el punteado de mtDNA, más redondeado en el tratamiento con CCCP.

#### 4.1.1.1.5 El reportero Mito-QC, una nueva herramienta para el estudio de la mitofagia

Como se describió en la introducción (**apartado 1.2.2.8 y Figura 1.15**) y en materiales y métodos (**apartado 3.1.2.3**), el reportero Mito-QC es una construcción que contiene mCherry-GFP fusionado con la secuencia de la proteína de membrana mitocondrial externa, FIS1. En condiciones basales, la red mitocondrial se ve fluorescente, tanto en rojo como en verde; sin embargo, durante la mitofagia, las mitocondrias que se encuentren dentro de los lisosomas no tendrán fluorescencia verde, ya que la fluorescencia de GFP se apaga por el microambiente ácido. Como la fluorescencia mCherry es estable a este pH, las mitocondrias dentro de los lisosomas fluorescen en rojo. Esto da lugar a la aparición de mitolisosomas, focos puntuales de mCherry (en rojo), que se pueden cuantificar fácilmente como índice de mitofagia celular [122].

Para evaluar si el reportero MitoQC es una buena herramienta para estudiar la mitofagia, utilizamos las células ARPE-19 con el reportero Mito-QC transfectado de manera estable. Estas células han sido establecidas en el laboratorio del Dr. Ian Ganley según como se describe en [122]. Es por ello que para estudiar la mitofagia, tratamos las células durante distintos tiempos (3 y 24 horas) con diferentes inductores de mitofagia, CCCP, AO, y como novedad, introducimos el DFO, un quelante de hierro que lleva a

condiciones de hipoxia y estabiliza HIF1 $\alpha$ , que induce la expresión de BNIP3 e induce mitofagia por esta vía. Posteriormente realizamos las fotos al confocal (**Figura 4.6**). Observamos en la **figura 4.6** mitofagia (puntos rojos que no colocan con el color verde) tanto a 3 horas de tratamiento como a 24 horas. En esta línea celular, el CCCP a 3 horas ya induce mitofagia, aunque en menores niveles que la AO o el DFO. En las células control a 24 horas, observamos que hay más mitofagia basal que a 3 horas. A 24 horas tanto la AO como el DFO inducen niveles muy elevados de mitofagia.

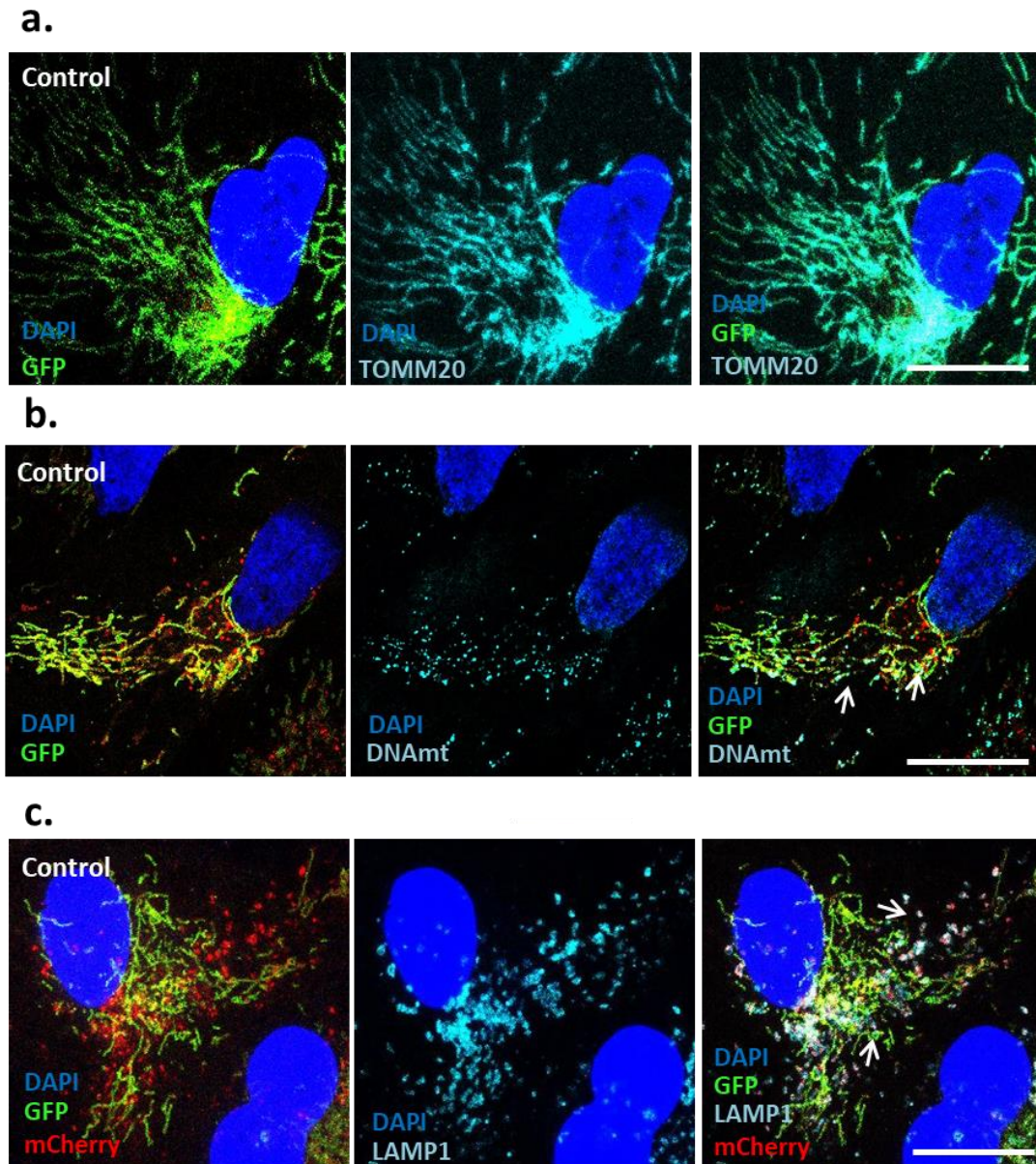


**Figura 4.6. Marcaje GFP-mCherry del reportero Mito-QC en células ARPE-19.** Se representa la tinción con el reportero Mito-QC durante 3 horas (**a.**) y 24 horas (**b.**) con diferentes tratamientos y sus respectivas cuantificaciones en la parte inferior. Proyecciones máximas con zoom de 2 de cada una de las fotos que hay en el recuadro en la zona superior izquierda (63x). Las flechas señalan los puntos rojos que corresponden a mitofagia. Se muestran las barras SEM;  $p^* < 0.05$ ;  $p^{**} < 0.01$ ;  $p^{***} < 0.001$ ;  $p^{****} < 0.0001$ . Test estadístico T-Student. Barras de escala de 10  $\mu$ m.

Para comprobar que la herramienta Mito-QC podía ser equiparable con nuestro marcaje de anticuerpos, lo que hicimos fue estudiar la colocación de GFP-mCherry con diferentes anticuerpos mitocondriales puestos ya a punto: DNAmT y TOMM20, así



como un marcador lisosomal para observar que los mitolisosomas corresponden a la tinción de LAMP1 (**Figura 4.7**). Se muestra que TOMM20 colocaliza con GFP. En el marcaje con DNAmT vemos que hay puntos de DNA que corresponden con los filamentos de GFP, y que LAMP1, colocaliza con mCherry totalmente. Por tanto, hay una colocalización tanto de las mitocondrias como de los mitolisosomas.



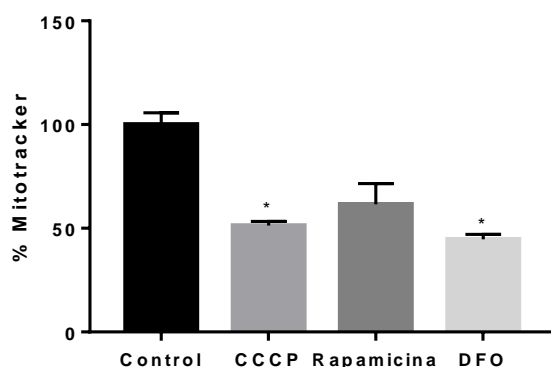
**Figura 4.7. Inmunofluorescencia con diferentes anticuerpos en células ARPE-19 Mito-QC.** Se muestra la inmunofluorescencia de los anticuerpos TOMM20 (a.), DNAmT (b.) y LAMP1 (c.) en células ARPE-19 Mito-QC. Proyecciones máximas con zoom de 2 de imágenes cogidas con objetivo de 63x. Las flechas señalan la colocalización con de Mito-QC con los diferentes anticuerpos. Barra de escala de 10  $\mu$ m.

Concluimos de este apartado de resultados que contamos con una variedad amplia de herramientas para estudiar la mitofagia en cultivo celular. Se han obtenido tanto técnicas como fármacos que nos permiten modular el proceso para poder estudiar el papel de la mitofagia en la fisiología celular. En el siguiente apartado vamos a validar si estos métodos pueden ser utilizados en nuestro sistema modelo que es la retina murina.

#### 4.1.1.2 Estudio de la mitofagia en la retina

##### 4.1.1.2.1 Inducción de mitofagia en retinas de ratones C57BL/6J: Citometría de flujo

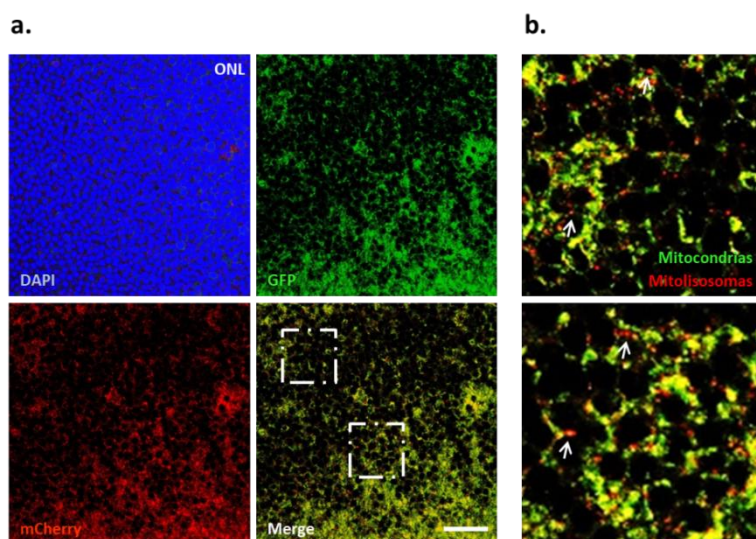
Después de optimizar la metodología en líneas celulares, lo que se llevó a cabo fue el uso de estos inductores de mitofagia en retinas, que es el tejido donde queríamos llevar a cabo el estudio del papel neuroprotector de la mitofagia. Para ello, se empleó el uso de CCCP, Rapamicina (inductor de autofagia mediante la inhibición de mTORC1) y DFO, durante 8 horas en retinas de ratones C57BL/6J en cultivo. Se midieron los niveles de MTDR para el estudio de la variación mitocondrial por citometría de flujo (**Figura 4.8**). Se llevaron a cabo cultivos de retina durante 8 horas como tiempo óptimo para observar los cambios en mitofagia y para mantener un estado fisiológico de la retina, ya que hemos observado que a tiempos altos la retina empieza a sufrir muerte celular debido al efecto del cultivo. Lo que se muestra en la **figura 4.8**, es que tanto el fármaco CCCP como DFO inducen mitofagia en retinas a 8 horas, mientras que la rapamicina, inductor de autofagia general, sólo presenta una tendencia. Por tanto, tenemos fármacos que podemos utilizar para el estudio de la mitofagia inducida en retinas montadas en plano en un estado fisiológico.



**Figura 4.8. Evaluación de la mitofagia mediante los niveles de MTDR por citometría de flujo.** Se representan diferentes niveles de MTDR con diferentes inductores de mitofagia durante un tiempo de 8 horas en retinas C57BL/6J. Se muestran las barras de SEM. \* $p < 0.05$ . Test estadístico T-Student.

### 4.1.1.2.2 Inducción de mitofagia en cultivos organotípicos de retina y epitelio pigmentario de ratones Mito-QC

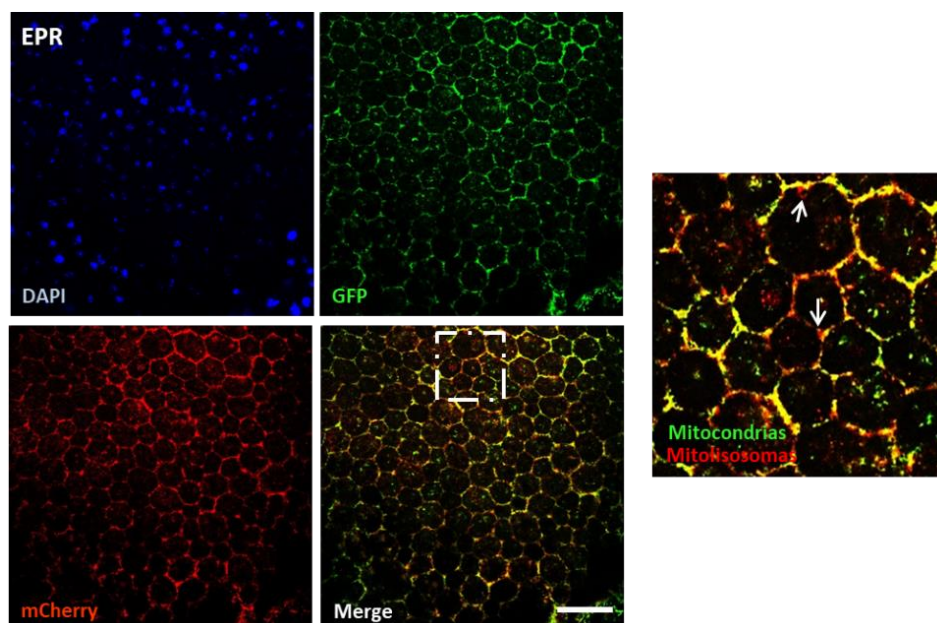
Habíamos comprobado que los inductores de mitofagia tenían efecto *ex vivo* en las retinas midiéndolo por citometría de flujo. Y queríamos ver ahora, si el reportero Mito-QC, nos podría servir para estudiar la masa mitocondrial y mitofagia también *ex vivo* **Figura 4.9**. Para ello y en colaboración con el grupo de Ian Ganley, hemos utilizado el ratón Mito-QC (**apartado 3.1.2.3 de materiales y métodos**). Como se muestra en la **figura 4.9**, podemos observar mediante el reportero Mito-QC la mitofagia y la masa mitocondrial en retinas montadas en plano, lo que nos aporta numerosas ventajas, ya que podemos hacer cultivos con diferentes fármacos para estudiar su dinamismo en la retina, así como estudiarla en las diferentes capas celulares que componen a dicho tejido.



**Figura 4.9.** La masa mitocondrial y la mitofagia pueden ser estudiadas mediante el reportero Mito-QC en retinas *ex vivo* mediante microscopía de fluorescencia. **a.** Tinción con DAPI y reportero Mito-QC de retinas montadas en plano de ratones Mito-QC. Barra de escala de 50µm. **b.** Aumento de las áreas señaladas en la imagen merge.

Aparte de las retinas, observamos si la mitofagia en el RPE también podíamos observarla con este reportero, ya que la retina y el RPE están intrínsecamente relacionados. El RPE tiene una función homeostática y de mantenimiento de los fotorreceptores, así como de reciclaje de los segmentos externos. Alteraciones en el RPE, pueden producir la degeneración de los fotorreceptores [147]. Se realizó el montaje en plano de los RPEs de ratones Mito-QC y se observaron al microscopio confocal (**Figura 4.10**).

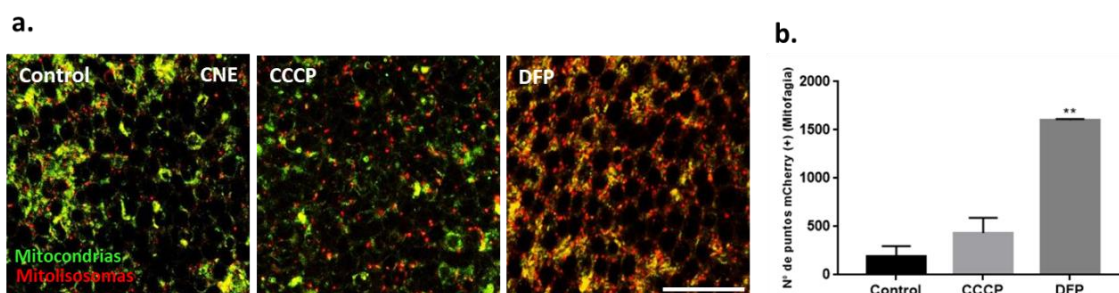




**Figura 4.10.** En el RPE se puede distinguir la mitofagia y la masa mitocondrial señalizada por el reportero Mito-QC. **a.** Tinción con DAPI y reportero Mito-QC de epitelio pigmentario montado en plano de ratones Mito-QC. Se muestran Z de 2  $\mu\text{m}$  de grosor. Barra de escala de 50 $\mu\text{m}$ . **b.** Aumento del área señalada en la imagen merge. Las flechas señalan mitolisosomas.

La mitofagia también podemos estudiarla en el RPE con la herramienta Mito-QC (**Figura 4.10**), lo que nos permite estudiar dicho proceso en ambos tejidos a la vez.

Una vez puesto a punto este método, se llevaron a cabo cultivos de explantes de retina durante 8 horas con dos inductores de mitofagia: CCCP y DFP, y por otro lado, se sometieron algunas retinas a condiciones de hipoxia para estudiar cómo afectaba a la mitofagia (**Figura 4.11**). Como se puede observar, el DFP induce mucho la mitofagia en estas condiciones, mientras que el CCCP, muestra una ligera tendencia.

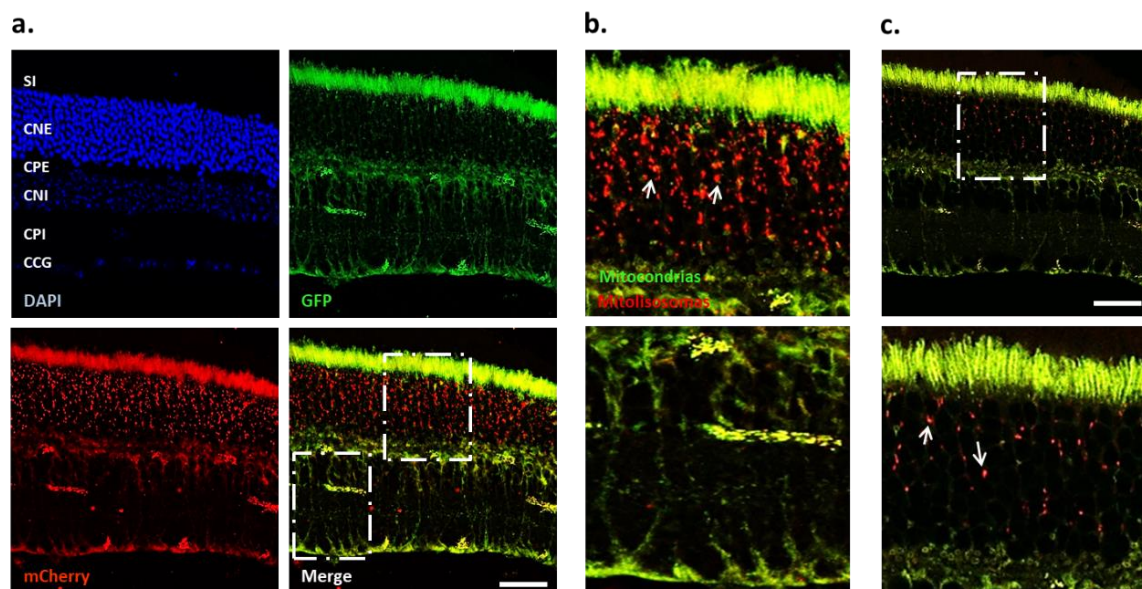


**Figura 4.11.** El DFP es el inductor de mitofagia que induce niveles más elevados en retinas *ex vivo*. **a.** Expresión del reportero Mito-QC de retinas montadas en plano de ratones Mito-QC con tratamientos de CCCP, DFP e hipoxia durante 8 horas. Se muestra un solo Z de 2  $\mu\text{m}$  de grosor. Barra de escala de 10 $\mu\text{m}$ . **b.** Aumento de las áreas señaladas en el plano (a.). **c.** Cuantificación de mitofagia en la capa de fotorreceptores de las retinas. Se muestran las barras SEM; \*\* $p < 0.01$ . Test estadístico de *T-Student*.



### 4.1.1.2.3 Estudio de mitofagia en cortes de ojo de ratones Mito-QC

Para estudiar la localización de la mitofagia en la retina, nos planteamos realizar cortes de ojo de ratón adulto de 3 meses de edad como herramienta para distinguir la presencia de mitofagia en las diferentes capas celulares que la componen. Se realizaron cortes de ojos de ratones Mito-QC y se observaron con microscopía confocal (**Figura 4.12**). Observamos que la mayor parte de la mitofagia en la retina tenía lugar en la CNE, que corresponde a la capa de los núcleos de los fotorreceptores. Este fenómeno nos llamó la atención, porque las mitocondrias, como podemos ver en la **Figura 4.12** y está descrito [222], se encuentran principalmente en los segmentos internos de los fotorreceptores, tanto de conos como de bastones, en las capas plexiformes donde tienen lugar las sinapsis entre las diferentes células que conforman la retina, así como en la capa de células ganglionares, pero, tanto en los segmentos externos de los fotorreceptores como en los somas de los mismos, no observamos ni se ha encontrado una presencia llamativa de mitocondrias.



**Figura 4.12. La capa nuclear externa de la retina presenta unos niveles elevados de mitofagia. a.** Proyecciones máximas de tinción con DAPI y reportero Mito-QC de secciones de ojos de 12  $\mu\text{m}$ . Barra de escala de 50  $\mu\text{m}$ . **b.** Aumento de las áreas señaladas en la imagen merge. **c.** Marcaje de reportero Mito-QC en una sola sección (Z) de 1  $\mu\text{m}$  (arriba) y aumento del área seleccionada en dicha sección (abajo). Las flechas señalan los mitolisosomas.

En este apartado concluimos que tenemos múltiples herramientas fiables para estudiar el papel de la mitofagia en la retina. Por otro lado, hemos conseguido modular la mitofagia en las retinas *ex vivo* en cultivo, lo que nos permite tratar las retinas a diferentes

tiempos y con diferentes estímulos para comparar en condiciones fisiológicas. También hemos visto que la mitofagia en la capa de fotorreceptores tiene una alta actividad, lo que apoya nuestra teoría de que la mitofagia tiene un papel importante en este tipo celular.

#### 4.1.2 Estudio comparativo de la mitofagia y la macroautofagia en el ojo de ratón en condiciones fisiológicas

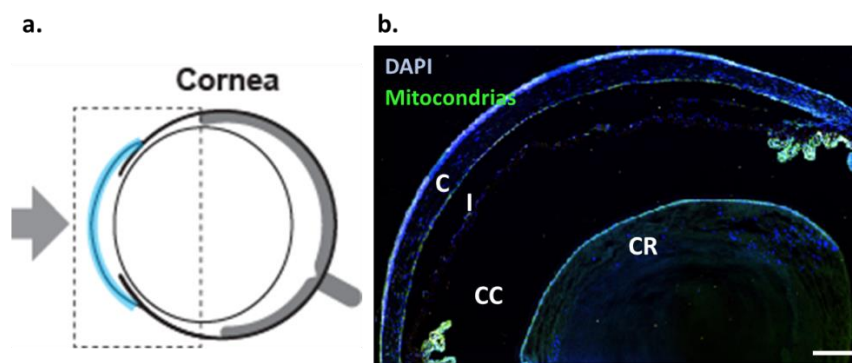
Una vez con las herramientas para estudiar la mitofagia puestas a punto, lo primero que hicimos, fue describir la mitofagia en diferentes partes del ojo de ratón, desde la córnea, que es por donde entra la luz, hasta el nervio óptico. Nuestro objetivo era tener una visión global de los niveles de mitofagia en el ojo tanto en edades embrionarias como adultas.

La correcta función mitocondrial es esencial para mantener la función visual, y en ello, tiene un papel clave la mitofagia. Aunque esta relación es conocida y algunos estudios apuntan a una mitofagia aberrante con la disfunción ocular, no se ha descrito nada acerca de la prevalencia de la mitofagia basal, o su relación con la autofagia general en el sistema visual [223]. Por lo tanto, nos propusimos, utilizando el ratón Mito-QC (señalado en las figuras como mitofagia) y otro modelo de ratón con un reportero de macroautofagia (GFP-mChery-LC3, descrito en las figuras como autofagia), describir la mitofagia basal y compararla con los niveles de macroautofagia en el ojo adulto y en desarrollo. La naturaleza casi idéntica de estos modelos de ratón, combinados con el hecho de que habían sido generados y criados de la misma manera, nos dio una oportunidad única para comparar el grado relativo de mitofagia, con respecto a la macroautofagia general, que ocurre *in vivo*.

Empezaremos con la caracterización desde la zona más externa del ojo, como es la córnea, hasta la zona más interna como es el RPE.

##### 4.1.2.1 Análisis comparativo de la autofagia y la mitofagia en la córnea

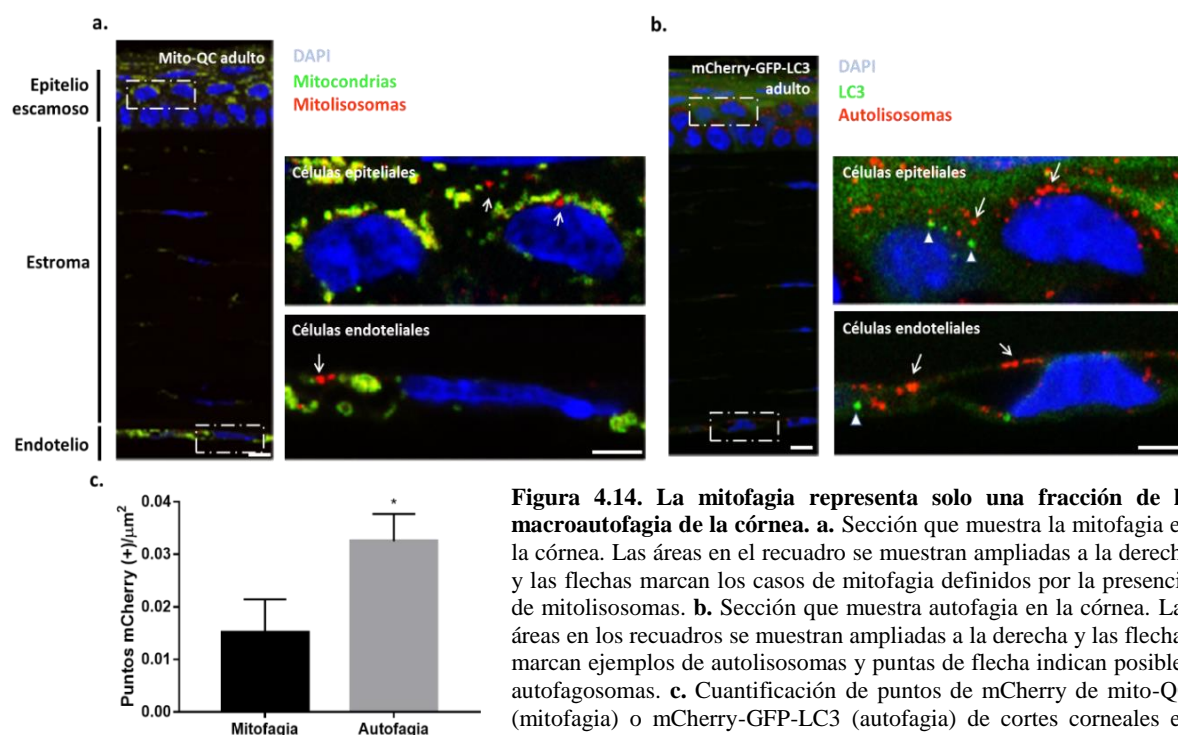
La córnea tiene un papel fundamental en la fisiología visual de los vertebrados, ya que representa el 80% del poder refractivo del ojo y la convexidad de su superficie permite que sus imágenes se centren en la retina. Su estructura, su posición y estructura se muestran en la **figura 4.13**.



**Figura 4.13. Posición y estructura de la córnea en un ojo de ratón.** **a.** Esquema del ojo de ratón que representa la ubicación de córnea en azul. El área en el recuadro representa la zona que se muestra el panel **b.** La flecha gris representa la trayectoria la de la luz que ingresa en el ojo. **b.** Imagen general de la sección del ojo mito-QC donde se observa la córnea (C), el iris (I), cuerpo ciliar (CC) y cristalino (CR). Barra de escala, 100  $\mu$ m.

Diferentes estudios basados en microscopía han establecido la córnea como un tejido rico en mitocondrias, y utilizando criosecciones de ojos de ratones Mito-QC adultos, pudimos verificar esto (**Figura 4.14**). Además, comparamos la mitofagia presente en las diferentes zonas de la córnea con la macroautofagia utilizando criosecciones de ojos de ratones mCherry-GFP-LC3.

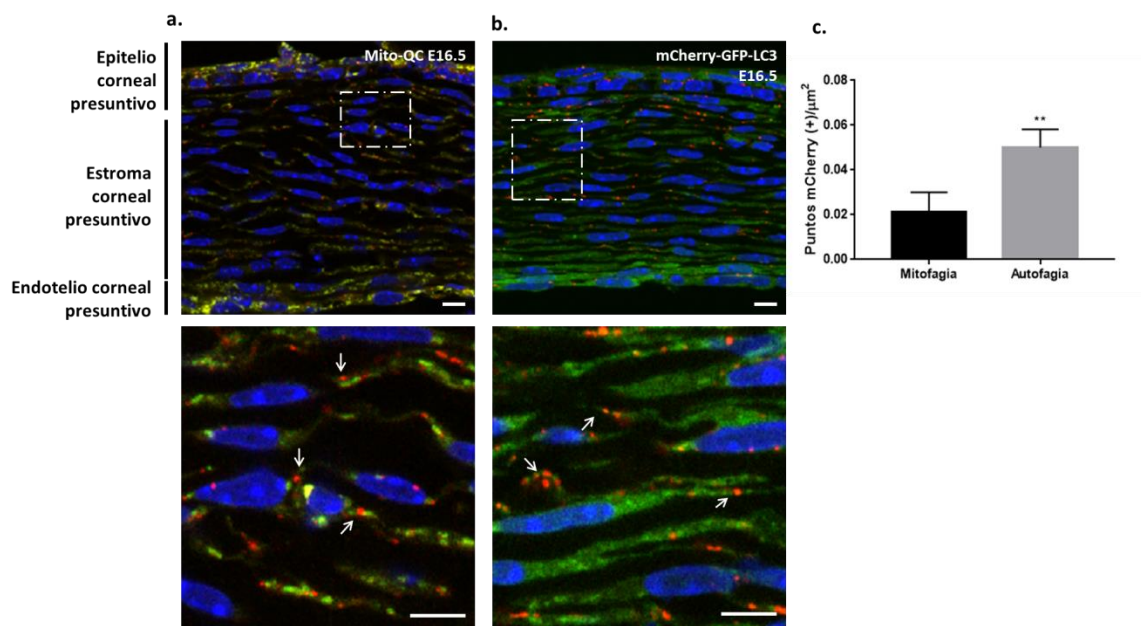
Las mitocondrias en la capa epitelial aparecieron punteadas y altamente ordenadas, sin embargo, en la capa endotelial aparecieron en forma de red. La mitofagia, como vemos en las figuras **4.14a.** y **c.**, también fue evidente tanto en el epitelio como en el endotelio. Hubo una mayor abundancia de autofagia general como se visualiza en las criosecciones de mCherry-GFP-LC3 (**Figuras 4.14 b. y c.**). Al comparar los dos modelos, parece que la mitofagia representa solo una fracción de la macroautofagia de la córnea.



**Figura 4.14. La mitofagia representa solo una fracción de la macroautofagia de la córnea.** **a.** Sección que muestra la mitofagia en la córnea. Las áreas en el recuadro se muestran ampliadas a la derecha y las flechas marcan los casos de mitofagia definidos por la presencia de mitolisosomas. **b.** Sección que muestra autofagia en la córnea. Las áreas en los recuadros se muestran ampliadas a la derecha y las flechas marcan ejemplos de autolisosomas y puntas de flecha indican posibles autofagosomas. **c.** Cuantificación de puntos de mCherry de mito-QC (mitofagia) o mCherry-GFP-LC3 (autofagia) de cortes corneales en los ojos. Se muestran las barras SEM; \* $p < 0.05$ . Test estadístico de *T-Student*. Barras de escala 10  $\mu\text{m}$ .

Datos de nuestro laboratorio han demostrado que la mitofagia es esencial para el desarrollo de la retina [40], por ello, exploramos si este fenómeno ocurre en la córnea en desarrollo.

Examinamos la córnea en secciones de ojo de ratones Mito-QC y mCherry-GFP-LC3 a E16.5 (**Figura 4.15**). Observamos un ligero aumento de la mitofagia en la córnea en desarrollo en comparación con el adulto, que es probable que se explique por el aumento en el número de queratinocitos estromales en desarrollo (**Figura 4.15 a. y c.**). Por el contrario, la autofagia general en la córnea a E16.5 aumenta en un 60% en comparación con la córnea adulta (**Figura 4.15 b. y c.**).

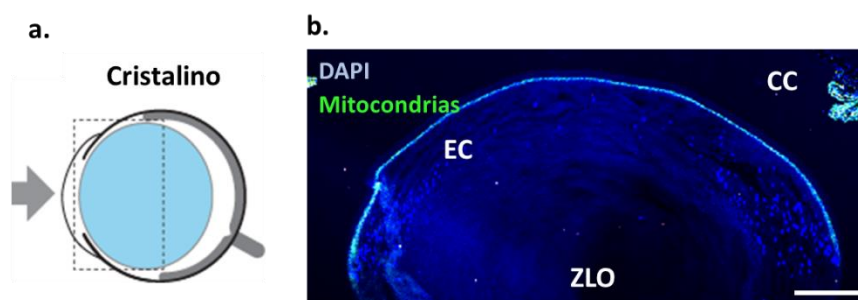


**Figura 4.15. Ligeramente aumento de mitofagia y aumento del 60% de autofagia general en retinas a E16.5 comparadas con retinas adultas. a.** Sección del ojo que detalla una mitofagia pronunciada en el estroma corneal a E16.5 de retinas Mito-QC. El área en el recuadro se muestra ampliada a continuación con flechas que marcan ejemplos de mitolisosomas **b.** Sección del ojo que detalla la autofagia en el estroma corneal de las retinas mCherry- GFP-LC3 a E16.5. El área en el recuadro se muestra ampliada a continuación con autolisosomas (flechas) y autofagosomas (puntas de flecha). **c.** Cuantificación de puntos mCherry (+) de Mito-QC (mitofagia) o mCherry-GFP-LC3 (autofagia) a E16.5 en secciones corneales del ojo. Se muestra la barra SEM. \*\*  $p < 0.01$ . Test estadístico de T-Student. Barras de escala 10  $\mu\text{m}$ .

Este periodo de desarrollo coincide con la síntesis de muchas moléculas de matriz en el endotelio, y puede ser que este aumento de la autofagia participe en la adaptación metabólica o remodelación en el ojo de los mamíferos [224].

#### 4.1.2.2 Mitofagia y autofagia en el cristalino

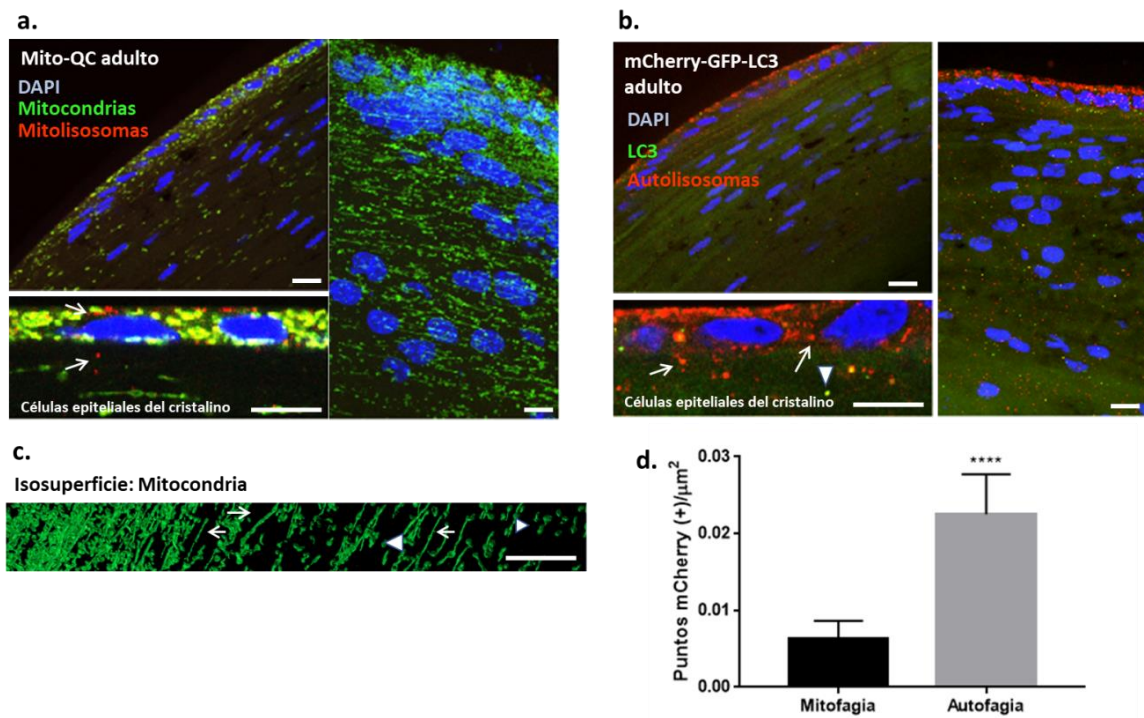
Posteriormente, estudiamos la mitofagia y la autofagia en el cristalino. Daños en las células epiteliales del cristalino o de fibra, o en el desarrollo del cristalino, pueden inducir opacidades que causan cataratas, que se estima que representa el 50% de la ceguera global [225]. A pesar de la extensa investigación sobre la autofagia en la lente adulta, poco se conoce sobre la homeostasis de la red mitocondrial en esta estructura. Como se muestra en la **figura 4.16a. y b.**, la lente anterior está cubierta por un epitelio cuboidal de células nucleadas, que se fusionan con una capa proliferativa en el margen ecuatorial.



**Figura 4.16. Estructura y capas celulares del cristalino de ojo de ratón adulto.** **a.** Esquema del ojo del ratón que representa la ubicación anatómica del cristalino en la zona azul. El área en el recuadro se muestra en el panel **b.** **b.** Descripción general de la fotomicrografía de la sección del ojo de mito-QC que representa el cristalino; EC, epitelio del cristalino; ZLO, zona libre de orgánulos; CC, cuerpo ciliar. Barra de escala, 100  $\mu\text{m}$ .

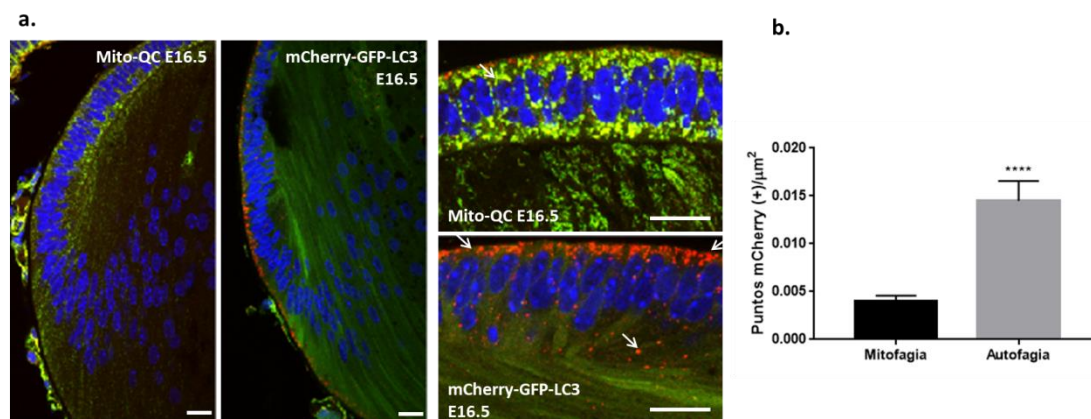
Cuando estudiamos la mitofagia en esta zona del ojo, curiosamente, observamos que en los ratones adultos Mito-QC había poca evidencia de mitofagia en las fibras o en el epitelio del cristalino adulto (**Figura 4.17 a. y d.**). La señal de Mito-QC fue suficiente para ver la morfología de las mitocondrias en las fibras ecuatoriales del cristalino (**Figura 4.17 a. y c.**). La representación de volumen 3D de la región ecuatorial, reveló mitocondrias alargadas intercaladas con mitocondrias circulares más pequeñas (**Figura 4.17 c.**). Las mitocondrias del epitelio de la lente fueron notablemente diferentes en morfología, aparecen más punteadas y menos conectadas en red que las de las células de fibra (**Figura 4.17 a.**). En las criosecciones de los ratones reporteros de autofagia, se muestra autofagia pronunciada en el epitelio del cristalino, y en menor medida en células de fibra (**Figura 4.17 b. y d.**). Estos datos demuestran que aunque la macroautofagia dependiente de LC3 ocurre en un alto grado en el cristalino, la eliminación selectiva de las mitocondrias por mitofagia tiene lugar en menor medida.





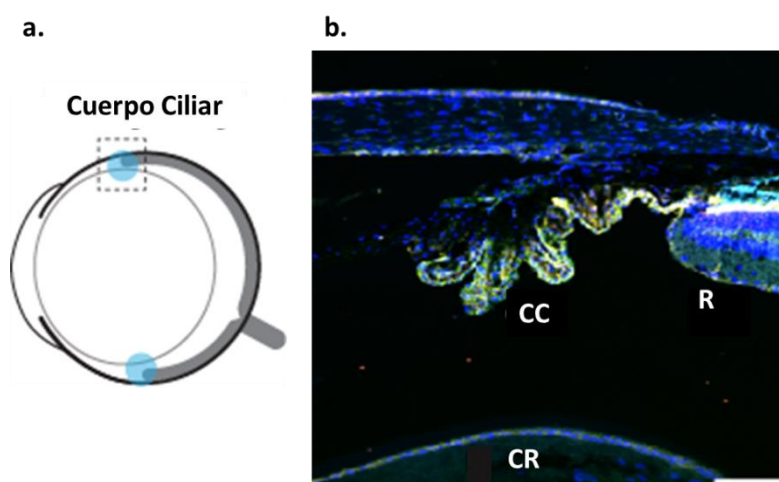
**Figura 4.17.** La macroautofagia dependiente de LC3 ocurre en un alto grado en el cristalino, la eliminación selectiva de las mitocondrias por mitofagia sucede en niveles inferiores. **a.** Arriba a la izquierda se muestra la sección óptica de la región ecuatorial del cristalino adulto de un ratón mito-QC, a continuación, se muestra el área magnificada del epitelio de la lente que muestra pequeñas mitocondrias esféricas y niveles bajos de mitofagia, con ejemplos de mitolisomas marcados por flechas. El panel a la derecha muestra la máxima proyección en Z de los cortes ópticos de la lente. **b.** El panel superior izquierdo muestra la sección óptica de la región ecuatorial del cristalino adulto de un ratón mCherry-GFP-LC3, a continuación, se muestra el área ampliada del epitelio de la lente con ejemplos de autolisomas marcados por flechas y autofagosomas por puntas de flechas. El panel de la derecha muestra la proyección en Z de un cristalino. **c.** Isosuperficie que detalla la red mitocondrial en mito-QC en el epitelio del cristalino, las flechas denotan ejemplos de mitocondrias alargadas y puntas de flecha mitocondrias solitarias que son más pequeñas. **d.** Cuantificación de puntos mCherry (+) de mito-QC (mitofagia) o mCherry-GFP-LC3 (autofagia) de secciones de cristalino. Se representan las barras SEM, \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . Test estadístico de *T-Student*. Barras de escala de 100  $\mu\text{m}$ .

Este escenario también parece manifestarse en el cristalino durante el desarrollo en E16.5, con un bajo nivel de mitofagia en comparación con la macroautofagia general en el epitelio del cristalino (**Figura 4.18**).



#### 4.1.2.3 Mitofagia y autofagia en el cuerpo ciliar

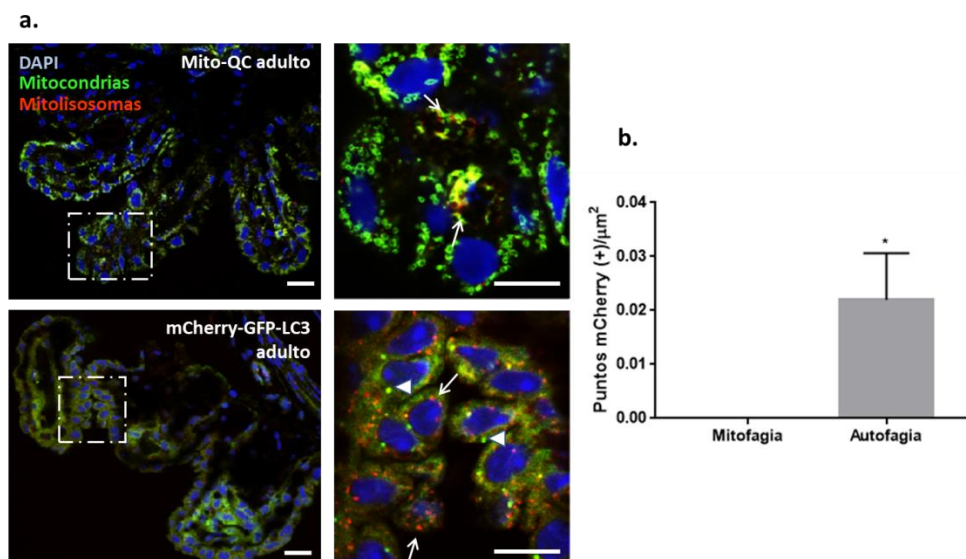
El cuerpo ciliar sostiene la integridad esférica del ojo facilitando el intercambio de metabolitos. El cuerpo ciliar está altamente vascularizado, con una superficie considerable para la secreción de fluidos, debido a su topología única de crestas ciliares cubiertas por un epitelio ciliar [226]. Su anatomía se describe en la **figura 4.19**.



**Figura 4.19. Anatomía y estructura del cuerpo ciliar.** a. Esquema del ojo del ratón adulto que representa la ubicación anatómica del cuerpo ciliar en azul claro. b. Sección óptica del ojo mito-QC que muestra el cuerpo ciliar (CC); retina periférica (R); cristalino (CR). Barra de escala, 100 µm.



Cuando estudiamos la mitofagia en esta parte de la retina, encontramos que las mitocondrias parecen pequeñas, esféricas y estrechamente compactadas (**Figura 4.20 a**). Sorprendentemente, no observamos mitofagia en estas células. En contraste, se observan elevados niveles de macroautofagia general donde los autofagosomas y autolisosomas son abundantes (**Figura 4.20**).



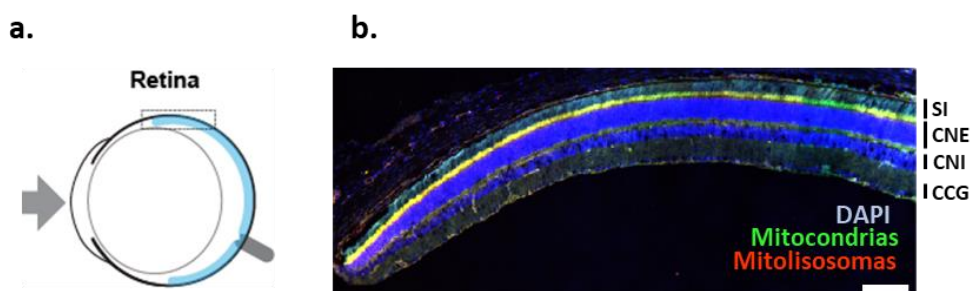
**Figura 4.20. Bajo nivel de mitofagia en comparación con la macroautofagia general en el cuerpo ciliar de ojo adulto.** **a.** Secciones ópticas del cuerpo ciliar del ojo de ratones mito-QC (arriba izquierda) y del cuerpo ciliar del ojo de ratones mCherry-GFP-LC3. El área en el recuadro se muestra ampliada al lado de su correspondiente. Las flechas marcan ejemplos de mitolisosomas y autolisosomas y puntas de flecha autofagosomas. **b.** Cuantificación de puntos mCherry (mitofagia) o mCherry-GFP-LC3 (autofagia) en secciones del cuerpo ciliar. Se muestran las barras SEM; \*  $p < 0.05$ . Test estadístico de *T-Student*. Barras de escala de 10  $\mu\text{m}$ .

Estas observaciones sugieren que la autofagia basal puede ser un importante regulador de la homeostasis del cuerpo ciliar.

### 4.1.2.4 Mitofagia y autofagia en la retina

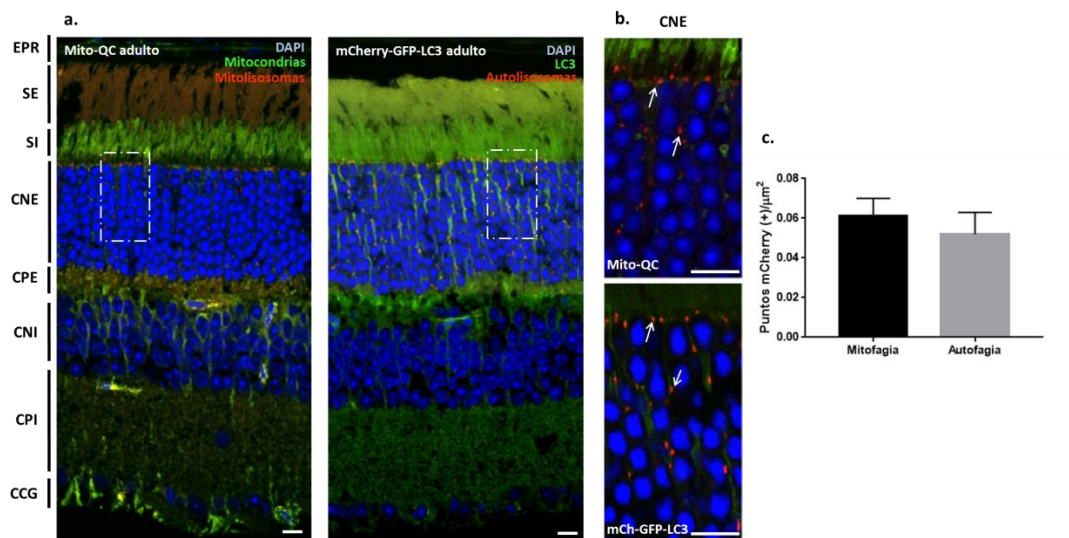
La presencia de autofagosomas se ha observado desde hace más de 40 años en la retina, y nuestros datos, junto con los de otros grupos, demuestran que la autofagia está implicada tanto en su desarrollo, como mantenimiento y degeneración [3]. Además, la disfunción mitocondrial aberrante contribuye a la patología de la retina [227], [228]. Aunque se han realizado menos trabajos en términos de mitofagia retiniana, estudios de microscopia muestran claramente la evidencia de mitocondrias en estructuras autofagosómicas, sugiriendo que es un proceso relevante. La retina es un componente del

SNC, y es considerada como uno de los tejidos mamíferos más metabólicamente activos [229] (**Figura 4.21**).



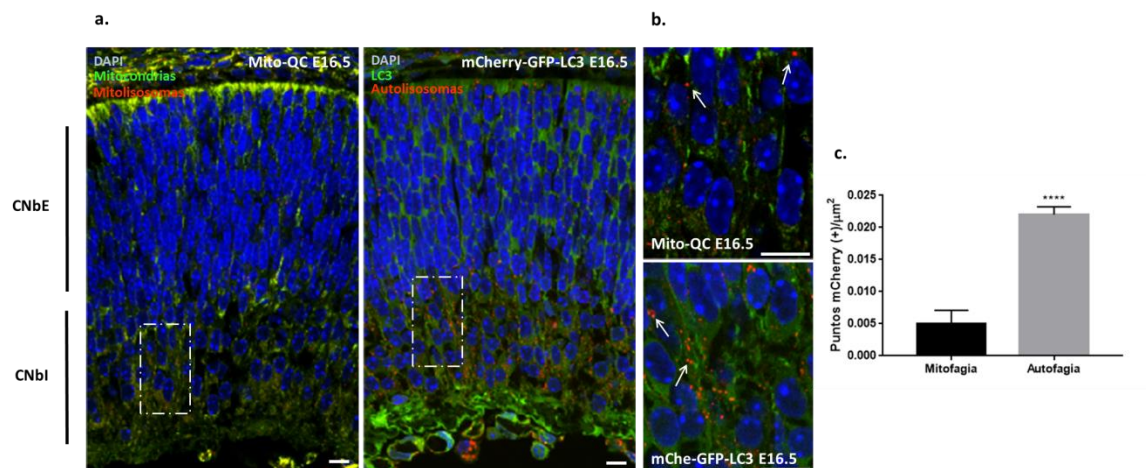
**Figura 4.21. Estructura y anatomía de la retina adulta de ratón.** **a.** Esquema del ojo del ratón que representa la ubicación anatómica de la retina en color azul. La región en caja se muestra en **b.** **b.** Sección óptica de la retina Mito-QC: SI, segmentos internos; CNE, capa nuclear externa; CNI; capa nuclear interna; CCG, capa de células ganglionares. Barra de escala, 100  $\mu\text{m}$ .

En cortes de animal adulto, hemos observado unos altos niveles de mitofagia en la CNE (**Figura 4.22**). Para determinar el grado de mitofagia en comparación con autofagia dependiente de LC3, comparamos secciones de retina de Mito-QC y ratones mCherry-GFP-LC3. Sorprendentemente, observamos un pronunciado y muy similar enriquecimiento de mitolisosomas y autolisosomas en la CNE de Mito-QC y ratones de autofagia respectivamente (**Figura 4.22**). Esto indica que casi toda la autofagia que tiene lugar en la CNE es mitofagia. Además, la CNE es la región del ojo donde más mitofagia se observa en relación al total de la macroautofagia.



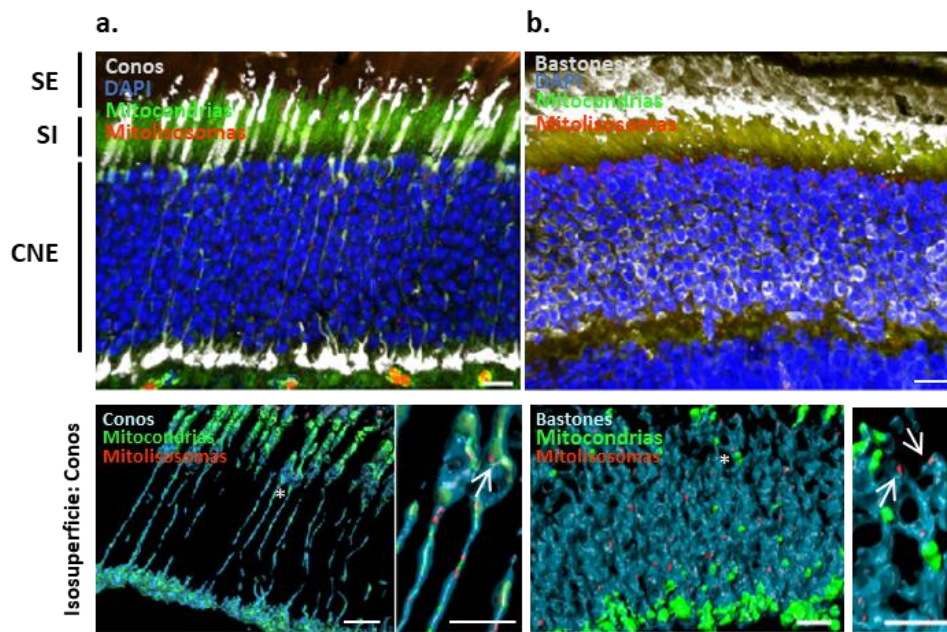
**Figura 4.22.** La CNE es la capa de la retina con más altos niveles de mitofagia, atribuyéndose la macroautofagia presente en esta capa a mitofagia. **a.** Secciones ópticas de mito-QC y mCherry-GFP-LC3 de retina. Las regiones encuadradas se muestran en el panel b. RPE, epitelio pigmentario de la retina; SE, segmento externo; CPE, capa plexiforme externa; CPI, capa plexiforme interna. **b.** Secciones magnificadas de ONL de mito-QC (panel superior) o mCherry-GFP-LC3 (panel inferior). Las flechas marcan ejemplos de mitofagosomas o autolisosomas. **c.** Cuantificación de puntos de mCherry de mito-QC (mitofagia) o mCherry-GFPLC3 (autofagia), incluidas todas las capas que se muestran en el panel **a**. Se muestran las barras  $\pm$  SEM. Test estadístico de T-Student. Barras de escala de 10  $\mu\text{m}$ .

Para determinar si la mitofagia retiniana se establece durante el desarrollo, analizamos secciones de ojos Mito-QC de E16.5 (**Figura 4.23**). La mitofagia en E16.5 está restringida a la capa interna de neuroblastos (CINb) (**Figura 4.23**). Además, en comparación con la retina adulta hay mucha más autofagia que mitofagia en la retina en desarrollo. El nivel de macroautofagia fue mayor en la CNbI, sin embargo, a diferencia de la mitofagia, los autolisosomas también estaban presentes en toda la retina que incluye la capa externa de neuroblastos (CENb). Nuestros datos *in vivo* proporcionan significado fisiológico a la mitofagia y la macroautofagia en la retina de mamíferos durante su desarrollo.



**Figura 4.23. La mitofagia en E16.5 está restringida a la capa interna de neuroblastos.** **a.** Secciones ópticas de retinas de mito-QC y mCherry-GFP-LC3 E16.5. Los recuadros en el área se muestran en el panel **b.** CNbE, capa de neuroblastos externa; CNbI, capa de neuroblastos interna. **b.** Sección ampliada de CNbI de retinas mito-QC (panel superior) y mCherry-GFP-LC3a E16.5 (panel inferior). Las flechas marcan ejemplos de mitofagosomas o autolisosomas. **c.** Cuantificación de puntos mCherry de secciones retinales de mito-QC (mitofagia) o mCherry-GFP-LC3 (autofagia) a E16.5. Se muestran las barras  $\pm$  SEM. (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ). Test de T-Student. Barras de escala de 10  $\mu\text{m}$ .

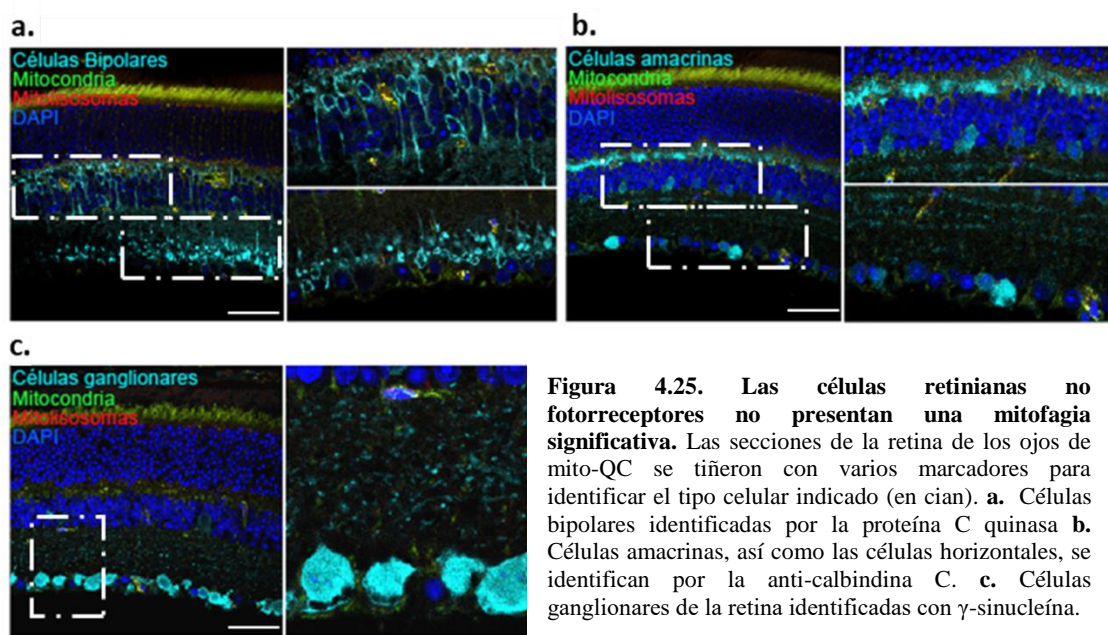
En la CNE se encuentran los cuerpos celulares de los fotorreceptores, siendo los bastones el tipo celular dominante en comparación con los conos (97% frente a 3%) respectivamente en ratones [230]. Para determinar en qué tipo de fotorreceptor se produce la mitofagia, utilizamos el anticuerpo arrestina de conos (para marcar conos) y arrestina visual (para marcar bastones) (**Figura 4.24**). La tinción con arrestina de conos permitió la visualización de las células incluidos los segmentos externos e internos, así como somas, axones y sus terminales sinápticas. Es importante destacar que los puntos solo mCherry, colocalizan con arrestina de cono, lo que indica que los conos tienen mitofagia (**Figura 4.24 a.**). La representación isosuperficial nos permitió visualizar la naturaleza espacial de mitofagia en estas células, y demostró, que la mitofagia se limita en gran medida al soma, como se ha visto en otros tipos de células neuronales [123], [213]. Como era de esperar, la tinción con la arrestina visual para marcar bastones, reveló que este tipo de célula está presente en mayor número (**Figura 4.24 b.**), y pudimos identificar claramente un número significativo de mitolisosomas en estas células.



**Figura 4.24. Los mitolisosomas se encuentran tanto en conos como en bastones en la retina de ratón. a.** Proyección máxima que muestra la capa nuclear externa (CNE) de mito-QC adulto teñida con anticuerpos contra la arrestina de conos (blanco, panel superior). También se indican los segmentos internos (SI) y externos (SE). El panel inferior izquierdo muestra la isosuperficie de células de cono (cian) de la micrografía anterior. El asterisco denota las proyecciones de los conos aumentadas en el panel inferior derecho, las flechas indican mitolisosomas. **b.** Proyección máxima de la retina mito-QC: Capa nuclear externa (CNE) y segmentos de células fotorreceptoras interna y externa (SI y SE respectivamente) teñidas con anticuerpos contra la arrestina visual para identificar células de bastones (blanco, panel superior). El panel inferior izquierdo muestra el renderizado de isosuperficie de somas de bastones (cian) de la micrografía anterior. El asterisco denota el área de las células que se muestra ampliada en el panel derecho y las flechas marcan mitolisosomas. Barras de escala de 10  $\mu$ m.

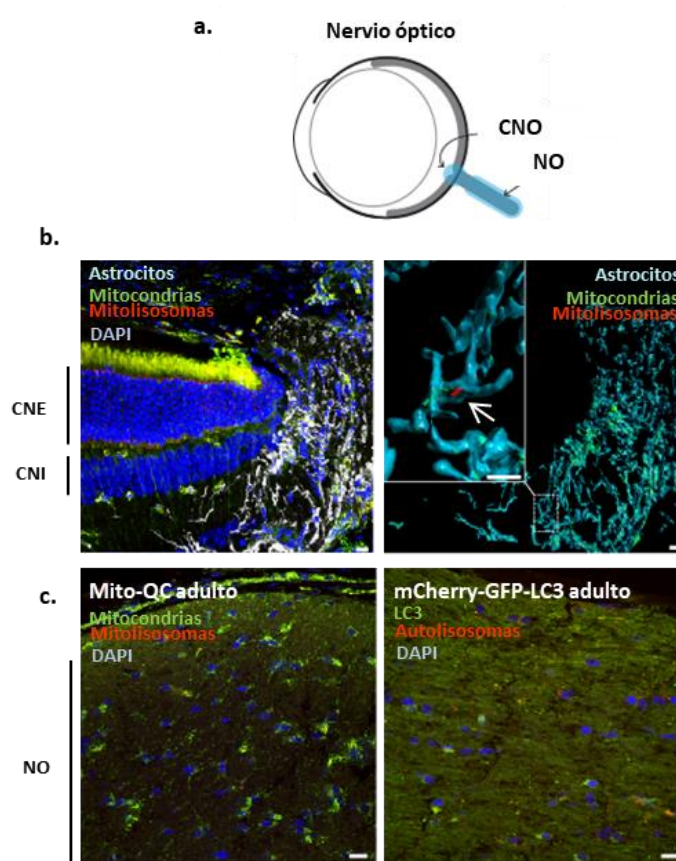
Las células amacrinas y bipolares transmiten señales desde los fotorreceptores hasta las células ganglionares de la retina, que a su vez, transmiten esta información a la corteza visual a través del nervio óptico. La naturaleza restrictiva de la mitofagia a la CNE sugiere que en las células amacrinas y bipolares no hay niveles significativos de mitofagia como se observa en la **Figura 4.25**.





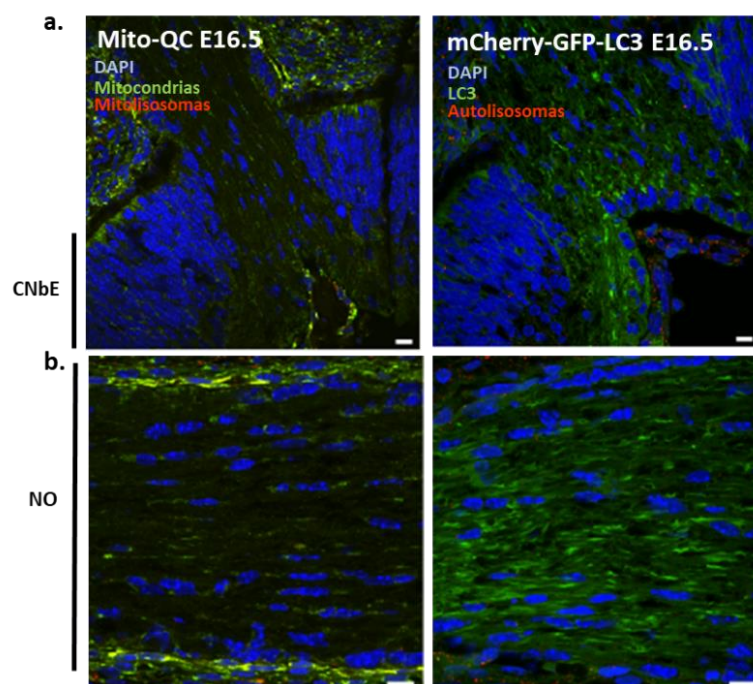
**Figura 4.25.** Las células retinianas no fotorreceptores no presentan una mitofagia significativa. Las secciones de la retina de los ojos de mito-QC se tiñeron con varios marcadores para identificar el tipo celular indicado (en cian). **a.** Células bipolares identificadas por la proteína C quinasa **b.** Células amacrinas, así como las células horizontales, se identifican por la anti-calbindina C. **c.** Células ganglionares de la retina identificadas con  $\gamma$ -sinucleína.

Posteriormente, estudiamos la mitofagia en el nervio óptico, ya que hay estudios que demuestran la existencia de mitofagia en los axones de la cabeza del nervio óptico *in vivo*, proceso conocido como trans-mitofagia axonal [231], [232]. Durante este proceso, las mitocondrias dañadas del axón de las células ganglionares son degradadas por los lisosomas de las células gliales [232]. Cuando evaluamos la mitofagia en la interfaz neuro-retiniana en animales Mito-QC, representada en la **Figura 4.26**, no observamos niveles elevados de mitofagia.



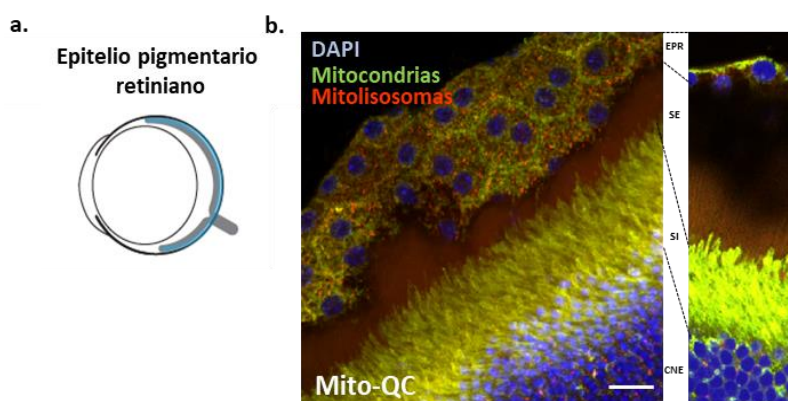
**Figura 4.26. Hay bajos niveles de mitofagia y macroautofagia en el nervio óptico de ojos de ratones adultos.** **a.** Esquema del ojo del ratón que representa la ubicación anatómica del nervio óptico en azul claro. **b.** Proyección máxima que muestra la cabeza del nervio óptico de ojo de mito-QC adulto, teñido con anti-GFAP para marcar astrocitos (blanco, panel izquierdo). Retina a la izquierda con la capa nuclear externa (CNE) y capa nuclear interna (CNI) marcadas. Panel derecho muestra isosuperficie con los astrocitos de la cabeza del nervio óptico (cian) y la región en caja se muestra ampliada a la izquierda. Los mitolisosomas son escasos y la flecha indica un ejemplo. **c.** Sección óptica de nervio óptico del ojo mito-QC (panel izquierdo) y mCherry-GFP-LC3 (panel derecho). Barras de escala de 10  $\mu\text{m}$ .

Esta ausencia de mitofagia y autofagia en el nervio óptico también se observa en los ojos a E16.5 (**Figura 4.27**).



**Figura 4.27.** Hay bajos niveles de mitofagia y macroautofagia en el nervio óptico de ojos embrionarios de E16.5. **a.** Sección óptica de nervio óptico de mito-QC (panel izquierdo) o mCherry-GFP-LC3 (panel derecho) de ojos a E16.5. Se indica la capa de neuroblastos externos (CNbE) de la retina en desarrollo. **b.** Sección óptica de NO de mito-QC (panel izquierdo) o mCherry-GFP-LC3 (panel derecho) a E16.5. Barras de escala de 10  $\mu$ m.

Por último, también evaluamos la mitofagia en el RPE en ratones Mito-QC (**Figura 4.28**). De las secciones pudimos observar la forma hexagonal de las células, las cuales son ricas en mitocondrias y muestran altos niveles de mitofagia *in vivo* (**Figura 4.28**).



**Figura 4.28.** Hay elevados niveles de mitofagia en el RPE **a.** Esquema del ojo que representa la ubicación del epitelio pigmentario de la retina en azul. **b.** Proyección de imágenes en 3D de la región retiniana externa. Obsérvese la forma hexagonal de la retina. Células del epitelio pigmentario (RPE). SE, segmentos externos; SI, segmentos internos, CNE, Capa Nuclear Externa. A la derecha hay una sección óptica que destaca la capa única de células del epitelio pigmentario.

Todos estos datos indican niveles elevados de mitofagia en los fotorreceptores de la retina a comparación del resto de tipos celulares.

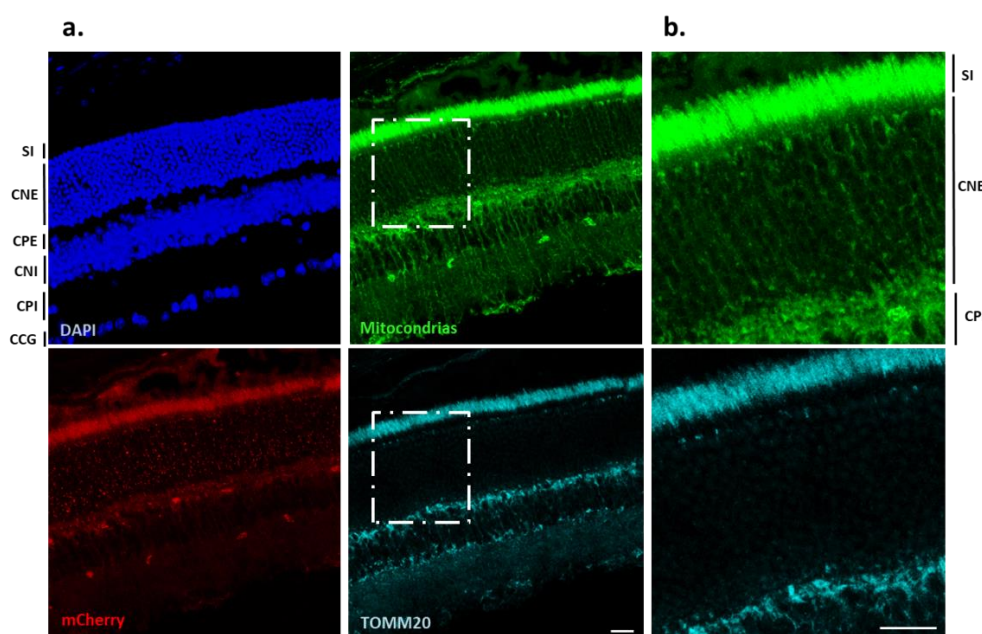


### 4.1.3 Mitofagia y masa mitocondrial en los somas y axones de fotorreceptores

Como se ha destacado anteriormente, encontramos unos niveles elevados de mitofagia en la capa nuclear de fotorreceptores, habiendo mitolisosomas tanto en los axones como en los somas. Este hecho nos sorprendió, ya que la CNE no es la capa de la retina donde hay más mitocondrias [222].

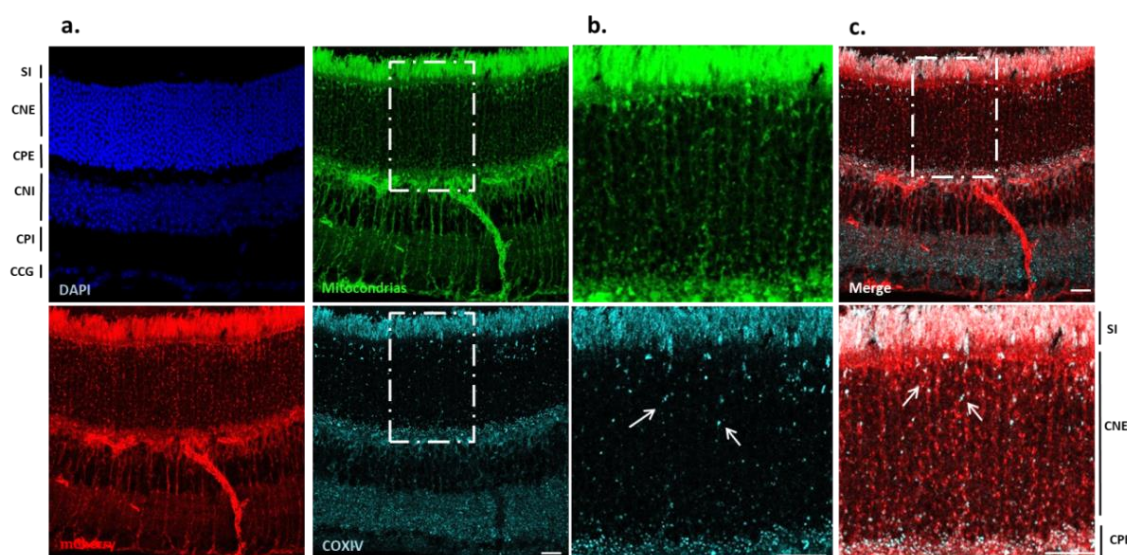
#### 4.1.3.1 Ausencia de altos niveles de mitocondrias en la capa nuclear externa

Lo primero que hicimos fue comprobar la presencia o no de mitocondrias en la CNE de las retinas de los ratones Mito-QC, y para ello, llevamos a cabo un marcaje con un anticuerpo anti TOMM20, proteína de la membrana externa mitocondrial (**Figura 4.29**). Como se muestra en la **figura 4.29**, no hay gran cantidad de mitocondrias en la capa externa (donde se encuentra el soma de los fotorreceptores), sin embargo, sí que se observaron niveles elevados tanto en el segmento interno como en la plexiforme interna, como está descrito en la literatura [222]. Sin embargo, nos siguió sorprendiendo, ya que, aunque no haya gran cantidad de mitocondrias, al menos donde observamos mitolisosomas tendríamos que ver mitocondrias colocalizando con los puntos mCherry (+).



**Figura 4.29. No hay un gran número de mitocondrias en la CNE de retinas de ratones adultos. a. Proyecciones máximas de secciones de retina de Mito-QC de ojos de adulto teñida con anticuerpo contra TOMM20 (cian). b. Imágenes ampliadas de las secciones en recuadro en las imágenes del panel a. SI, segmento interno; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de células ganglionares. Barras de escala de 50 μm.**

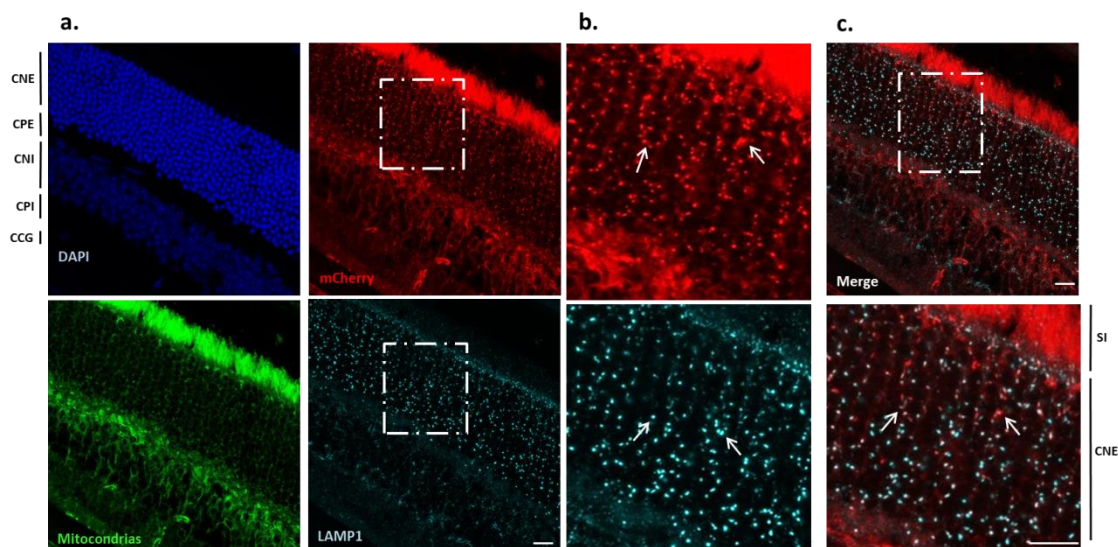
Es por ello que nos planteamos la hipótesis de si quizá cuando las mitocondrias están dentro del lisosoma se pierde la estructura de la mitocondria y las proteínas de la membrana externa son las primeras en degradarse. Por esto, decidimos estudiar la presencia de COXIV, que en este caso, es una proteína de la matriz mitocondrial (**Figura 4.30**). Lo que observamos fue que con el marcaje mitocondrial con COXIV, podemos visualizar la mínima cantidad de mitocondrias que se encuentran en la CNE. Y que estas mitocondrias, algunas de ellas, sobre todo en la parte superior de la CNE, coinciden con los mitolisosomas. Sin embargo, hay muchos más mitolisosomas que mitocondrias, por lo que concluimos que la mayoría de las mitocondrias en la CNE están en el interior de autofagosomas en diferentes estadios de degradación.



**Figura 4.30.** Con el marcaje de una proteína de la matriz mitocondrial, se visualizan algunas mitocondrias en la CNE que coinciden con mitolisosomas. **a.** Proyecciones máximas de secciones de retina de Mito-QC de ojos de adulto teñida con anticuerpo contra COXIV (cian). **b.** Imágenes ampliadas de las secciones en recuadro en las imágenes del panel a. **c.** En el panel superior, se muestra el merge de las tinciones de mCherry y COXIV, en el panel inferior, imagen ampliada de la sección en recuadro en la imagen superior. SI, segmento interno; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de células ganglionares. Barras de escala de 50  $\mu\text{m}$ .

#### 4.1.3.2 *Hay un transporte axonal de los mitolisosomas desde los segmentos internos de los fotorreceptores hasta la CNE*

Nos preguntamos entonces si estos mitolisosomas coincidirían con un marcaje lisosomal con LAMP-1, proteína presente en la membrana de los lisosomas (**Figura 4.31**). La mayoría de los lisosomas presentes en la CNE coinciden con los mitolisosomas.



**Figura 4.31. Los mitolisosomas de la CNE de una retina de ratón adulto coinciden con el marcaje de LAMP1. a.** Proyecciones máximas de secciones de retina de Mito-QC de ojos de adulto teñida con anticuerpo contra LAMP1 (cian). **b.** Imágenes ampliadas de las secciones en recuadro en las imágenes del panel a. **c.** En el panel superior, se muestra el merge de las tinciones de mCherry y LAMP1, en el panel inferior, imagen ampliada de la sección en recuadro en la imagen superior. SI, segmento interno; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de células ganglionares. Barras de escala de 50  $\mu\text{m}$ .

En función de estos resultados, nos planteamos estudiar la mitofagia basal de la retina externa mediante flujo. Para ello utilizamos la leupeptina como inhibidor del flujo autofágico, poniendo además los ratones en condiciones de ayuno. Para ello, los ratones se ayunaron durante dos noches, poniéndoles comida por el día, y se inyectó leupeptina durante las últimas 18 horas para inhibir el flujo. Comparamos la eficacia de poner a los ratones en ayuno, de la leupeptina, y de ambos juntos comparando retina total, SI, CNE y CPE, que son las capas donde observamos mitolisosomas con los diferentes tratamientos (**Figura 4.32**).

En la retina entera (**Figura 4.32 a-d, e**), se observó un incremento de puntos rojos al tratar con leupeptina y con el tratamiento de ayuno con leupeptina. Observamos que hay cambio de localización de mitofagia según los tratamientos, siendo llamativo sobre todo en el tratamiento de leupeptina, donde la mitofagia la vemos acumulada en la parte inferior de los segmentos internos de los fotorreceptores y en los pies de los FR.

En la CNE de los animales en condiciones de ayuno con leupeptina (**Figura 4.32 a-d, f**), se observó un bloqueo de degradación de mitocondrias, y por tanto, una acumulación

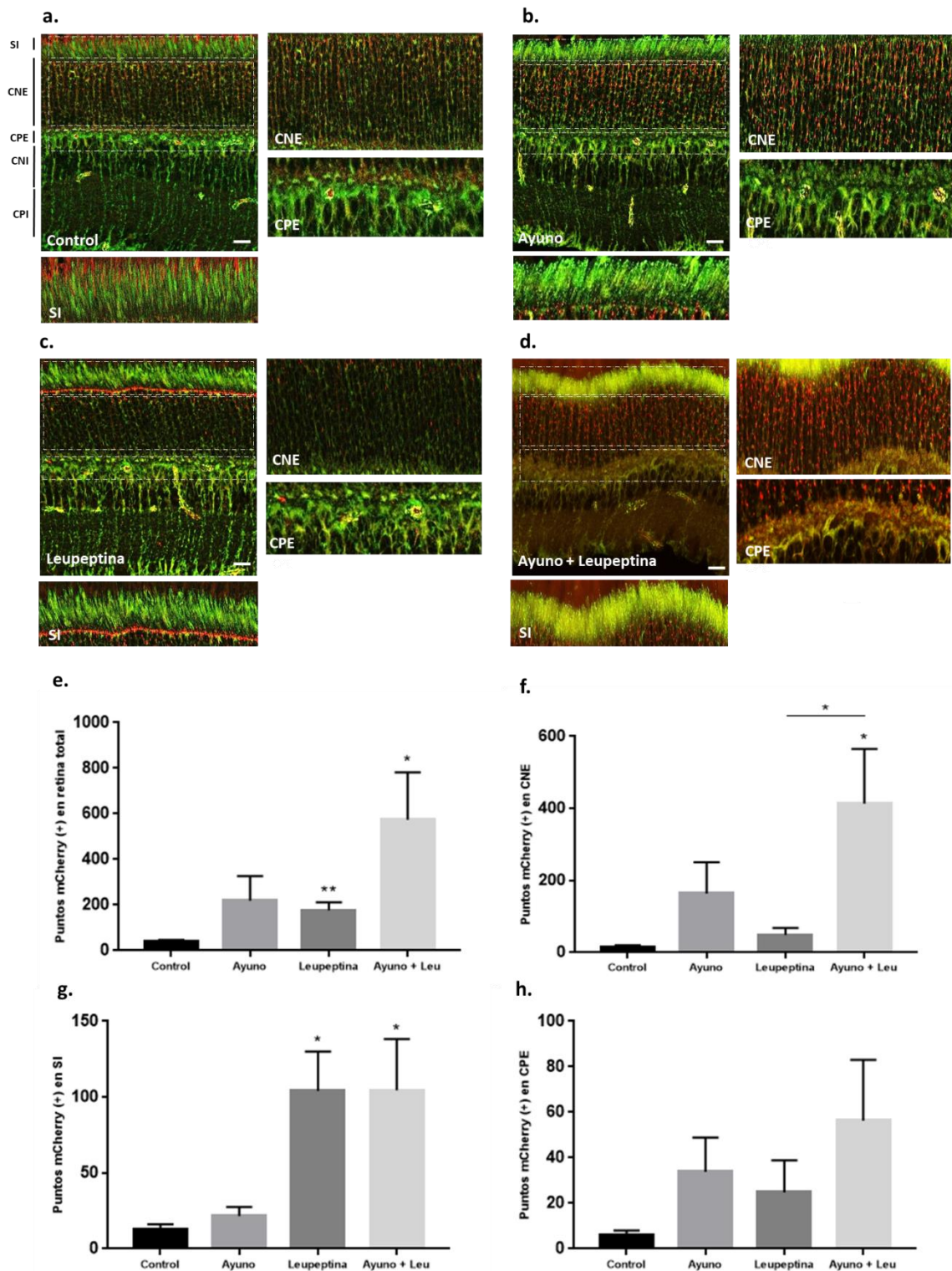
de puntos rojos. Sin embargo, los ratones que solo han sido tratados con leupeptina, muestran niveles de mitofagia similares al control pero en diferente localización.

En los segmentos internos de los fotorreceptores de los animales tratados con leupeptina (**Figura 4.32 a-d, g**), hay un aumento de puntos rojos, cuando con este tratamiento no veíamos aumento en la CNE (**Figura 4.32 a-d, f**). También vemos aumento de mitofagia cuando se pusieron a los ratones en condiciones de ayuno y además se trataron durante 18 horas con leupeptina. Hay que destacar, que este aumento en los SI se da en la parte más inferior, que es posible que coincida con la zona de sinapsis con la glia de Müller. La mitofagia no se encuentra por todo el segmento interno.

La última capa celular de la retina que analizamos fue la CPE (**Figura 4.32 a-d, h**), y no se apreciaron cambios significativos en mitofagia en esta capa.

En el resto de capas celulares no se aprecian mitolisosomas como ha sido descrito en el **apartado 4.1.2.4**.





**Figura 4.32.** Hay acumulación de puntos rojos con leupeptina y ayuno con leupeptina, con un cambio de localización de mitofagia en el tratamiento con leupeptina. Proyecciones máximas de retina de Mito-QC de ojos de adulto control (a.), ayuno (b.), leupeptina (c.) y ayuno más leupeptina (d.). Cuantificación de puntos mCherry positivos en las secciones de retinas de ratones Mito-QC en retina total (e.), CNE (f.), SI (g.) y CPE (h.) comparando los diferentes tratamientos. SI, segmento interno; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna. Barras de escala de 50  $\mu\text{m}$ . Se muestran las barras SEM; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

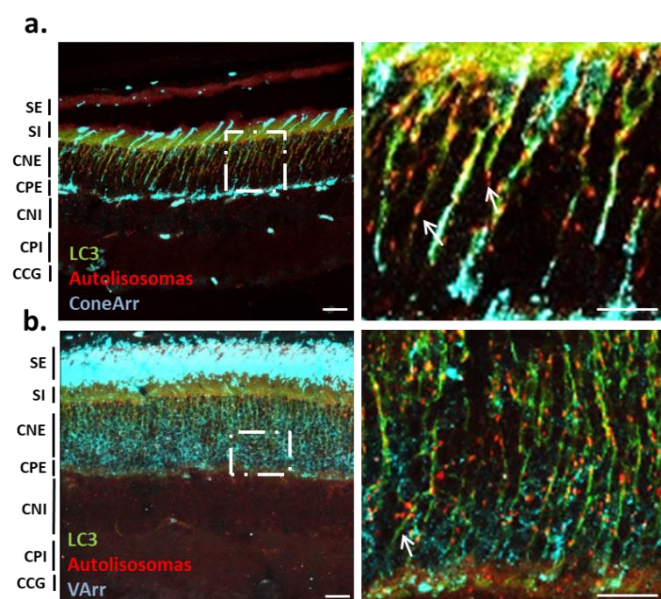
Planteamos en función de este estudio, una posible translocación de los mitolisosomas desde los SI hasta la CNE, ya que la mitofagia tiene lugar en un sitio diferente a donde se encuentran las mitocondrias que es en los segmentos internos. La leupeptina aparte de inhibir la degradación lisosomal [233], inhibe el transporte axonal de autolisosomas [234].

Planteamos por tanto un transporte axonal de los mitolisosomas desde los SI, que es donde están las mitocondrias, a la CNE, donde en el ratón control se encuentra la mitofagia más activa.

#### ***4.1.3.3 Comparación de la mitofagia con la autofagia general en las diferentes células de la retina utilizando los animales mCherry-GFP-LC3***

Nuestros datos indican que en la retina murina hay niveles elevados de mitofagia en la CNE, así que decidimos estudiar si la mitofagia que veíamos en la CNE era específica, o bien, también había niveles elevados de macroautofagia y si solamente se producía en esa capa o en general en toda la retina. Como observamos en la **figura 4.22**, también se observan gran número de autolisosomas en la CNE, concluyendo por tanto que la mayor parte de la macroautofagia de la CNE es mitofagia.

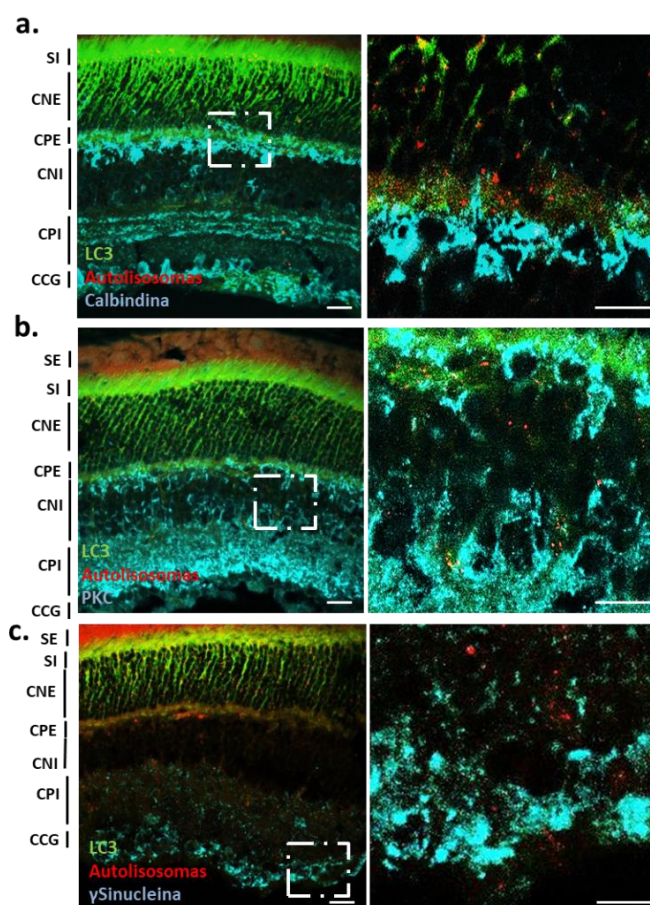
Nuestros datos hasta el momento indican elevados niveles de mitofagia en los fotorreceptores de la retina y bajos en el resto de los tipos celulares. Utilizando el ratón mCherry-GFP-LC3, quisimos comparar cuales eran los niveles de autofagia general en las células de la retina. Para ello, utilizamos secciones de retina adulta de estos animales y anticuerpos tanto para células de la retina externa (anti-arrestina de conos y anti-arrestina visual; **Figura 4.33**), para estudiar si la macroautofagia está en ambos tipos de fotorreceptores, como para células de la retina interna (anti-calbindina, anti-PKC y anti- $\gamma$ -sinucleína; **Figura 4.34**). También utilizamos anticuerpos para células no neurales (anti-glutamina sintetasa; **Figura 4.35**). Como era de esperar observamos elevados niveles de macroautofagia tanto en los conos como en los bastones, por lo que un elevado % de la macroautofagia presente en esta zona corresponde a mitofagia (**Figura 4.33**).



**Figura 4.33. La macroautofagia se encuentra tanto en los conos como en los bastones de la retina de ratones adultos.** **a.** Sección óptica (un  $Z=1\ \mu\text{m}$ ) de retina de mCherry-GFP-LC3 (panel izquierdo) de ojos de adulto teñida con anticuerpo contra la arrestina de conos (cian). El panel derecho muestra la imagen ampliada de la sección en caja en el panel izquierdo. **b.** Sección óptica (un  $Z=1\ \mu\text{m}$ ) de retina de mCherry-GFP-LC3 (panel izquierdo) de ojos de adulto teñida con anticuerpo contra la arrestina visual (cian). El panel derecho muestra la imagen ampliada de la sección en caja en el panel izquierdo. Las flechas marcan autolisosomas. SE, segmento externo; SI, segmento interno; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de células ganglionares. Barras de escala de  $50\ \mu\text{m}$ .

El resto de tipos celulares de la retina no poseen tanta autofagia como los fotorreceptores (**Figura 4.34**).

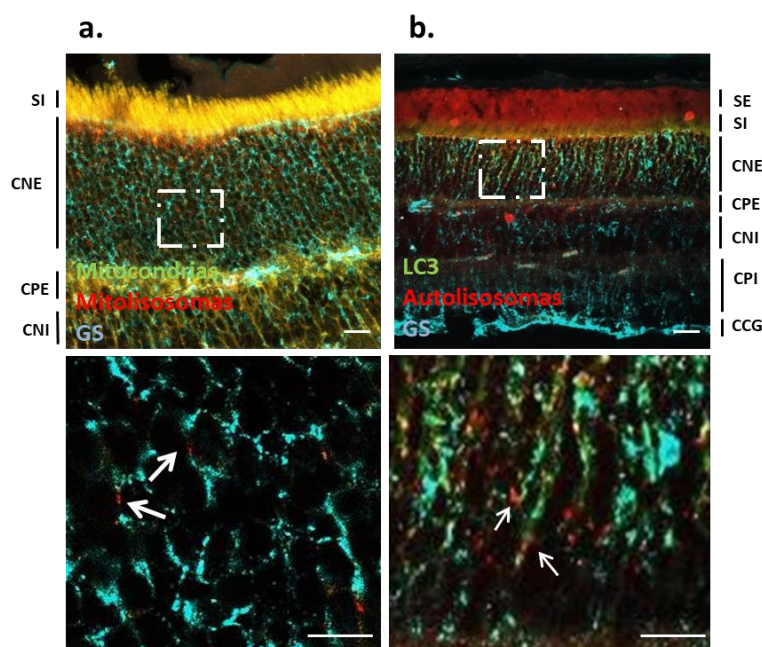
**Figura 4.34. Los autolisosomas no están presentes en las células que componen la retina interna.** **a.** Sección óptica de retina de mCherry-GFP-LC3 (panel izquierdo) de ojos de adulto teñida con anticuerpo contra calbindina (cian). El panel derecho muestra la imagen ampliada de la sección en caja en el panel izquierdo. **b.** Sección óptica de retina de mCherry-GFP-LC3 (panel izquierdo) de ojos de adulto teñida con anticuerpo contra la proteína PKC (cian). El panel derecho muestra la imagen ampliada de la sección en caja en el panel izquierdo. **c.** Sección óptica de retina de mCherry-GFP-LC3 (panel izquierdo) de ojos de adulto teñida con anticuerpo contra la  $\gamma$ -sinucleína (cian). El panel derecho muestra la imagen ampliada de la sección en caja en el panel izquierdo. SE, segmento externo; SI, segmento interno; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de células ganglionares. Barras de escala de  $50\ \mu\text{m}$ .





Estos datos sugieren un papel prominente de la mitofagia en los fotorreceptores.

La glía de Müller, la glía más abundante de la retina de vertebrados, tiene una morfología elaborada caracterizada por un tallo vertical que se extiende por la retina y las ramas en cada capa de la retina. La glía de Müller desempeña diversos papeles esenciales en la homeostasis retiniana. Por ejemplo, promover la formación de sinapsis y ayudar a mantener la función neuronal al proporcionar a los terminales nerviosos sustratos de energía y precursores de neurotransmisores [235], que presumiblemente están habilitados por su compleja anatomía. Nos preguntamos entonces, si la mitofagia o la macroautofagia están involucradas en esta función homeostática de la glía de Muller (**Figura 4.35**).



**Figura 4.35. Los mitolisosomas y autolisosomas están presentes en la glía de Müller que se expande por toda la retina. a.** Sección óptica (un  $Z=1\ \mu\text{m}$ ) de retina de mito-QC (panel superior) teñida con anticuerpo contra glutamina sintetasa (cian). El panel inferior muestra la imagen ampliada de la sección en recuadro. **b.** Sección óptica (un  $Z=1\ \mu\text{m}$ ) de retina de mCherry-GFP-LC3 (panel superior) teñida con anticuerpo contra glutamina sintetasa (cian). El panel inferior muestra la imagen ampliada de la sección en recuadro. SE, segmento externo; SI, segmento interno; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de células ganglionares. Barras de escala de  $50\ \mu\text{m}$ .

En la glía de Müller hay tanto autolisosomas como mitolisosomas, lo que indica que es posible que la autofagia esté implicada en la función homeostática de la glía de Müller.

Por tanto, concluimos que la mayor parte de la macroautofagia que observamos en la CNE es mitofagia.



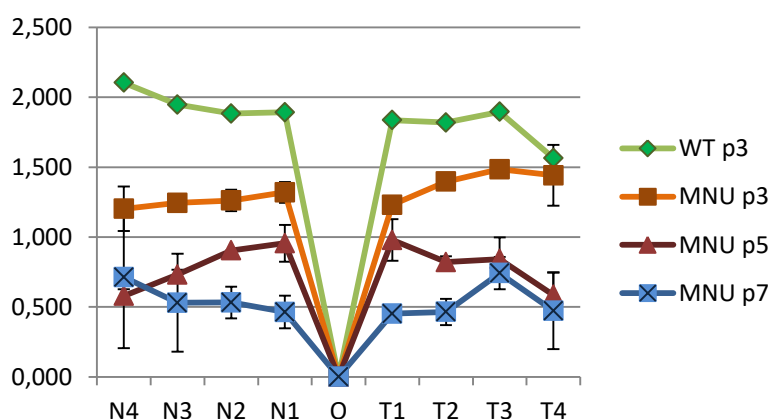
### 4.1.4 La mitofagia en la retina en un modelo de degeneración de fotorreceptores inducido por MNU

Decidimos por tanto utilizar los ratones Mito-QC y mCherry-GFP-LC3 para estudiar el papel de la mitofagia en la degeneración de fotorreceptores. Para ello, simulamos un modelo de retinitis pigmentaria con el fármaco N-Methyl-N-nitrosourea (MNU). Esta molécula induce específicamente muerte de los fotorreceptores por apoptosis y ha sido utilizado como modelo de RP [200].

#### 4.1.4.1 El MNU es un buen modelo farmacológico que induce la muerte de fotorreceptores

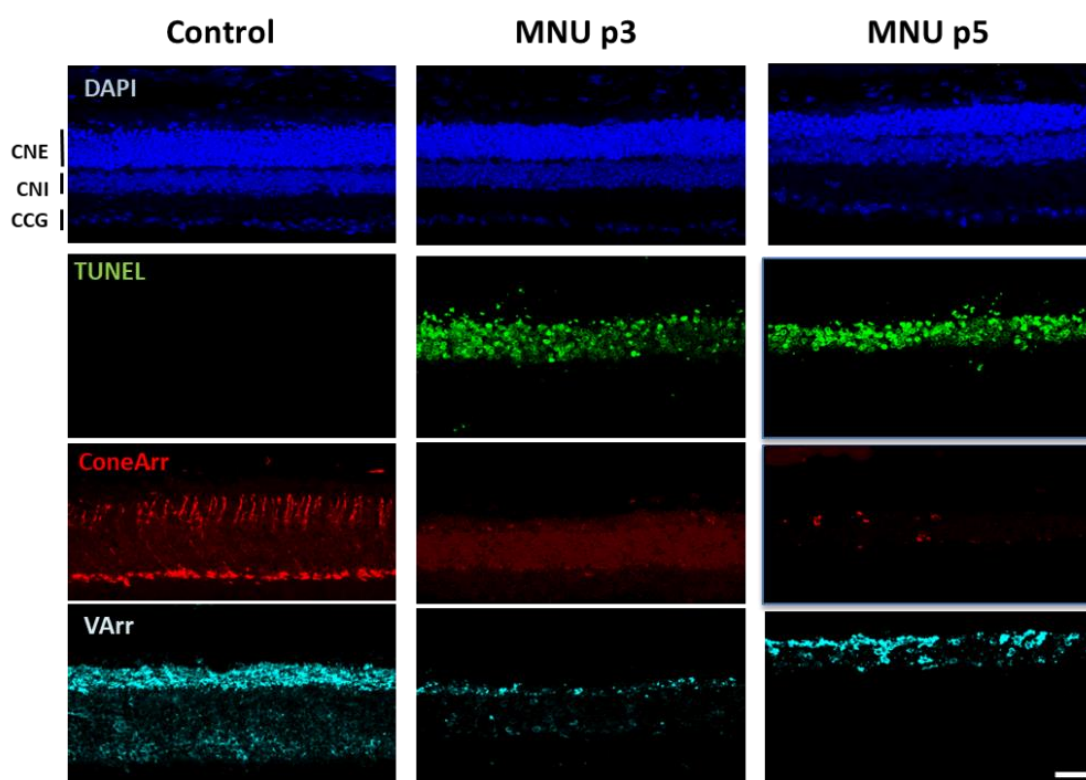
El MNU causa estrés oxidativo aumentando las especies oxidativas como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o ROS [200]. Además, induce la acumulación de iones Ca<sup>2+</sup> dentro de la célula, lo que resulta en la activación de la calpaína-2 y muerte celular [203]. Estos fenómenos suceden también en la enfermedad de Retinosis Pigmentosa y en el modelo rd10 [51], [236].

Para determinar la cinética en la pérdida de fotorreceptores hicimos, en primer lugar, un estudio exploratorio de tiempo de tratamiento con MNU. Realizamos una única inyección intraperitoneal de MNU en ratones wild-type, y lo dejamos actuar 3, 5 y 7 días. Posteriormente se cortaron los ojos se tiñeron los núcleos y se cuantificó la relación ONL/INL teniendo en cuenta el gradiente nasal-temporal de la retina (**Figura 4.36**). Como se muestra en la **figura 4.36**, hay una disminución progresiva de la capa de fotorreceptores según van aumentando los días de tratamiento con MNU.



**Figura 4.36. Disminución del ratio ONL/INL en retinas wild-type según aumentan los días de tratamiento con MNU.** Cuantificación del ratio ONL/INL en secciones de retinas de animales C57BL/6J comparando ratones inyectados con el vehículo de MNU y ratones con el tratamiento de MNU dejándolo actuar durante diferentes tiempos (3, 5 y 7 días). Se muestran las barras  $\pm$  SEM.

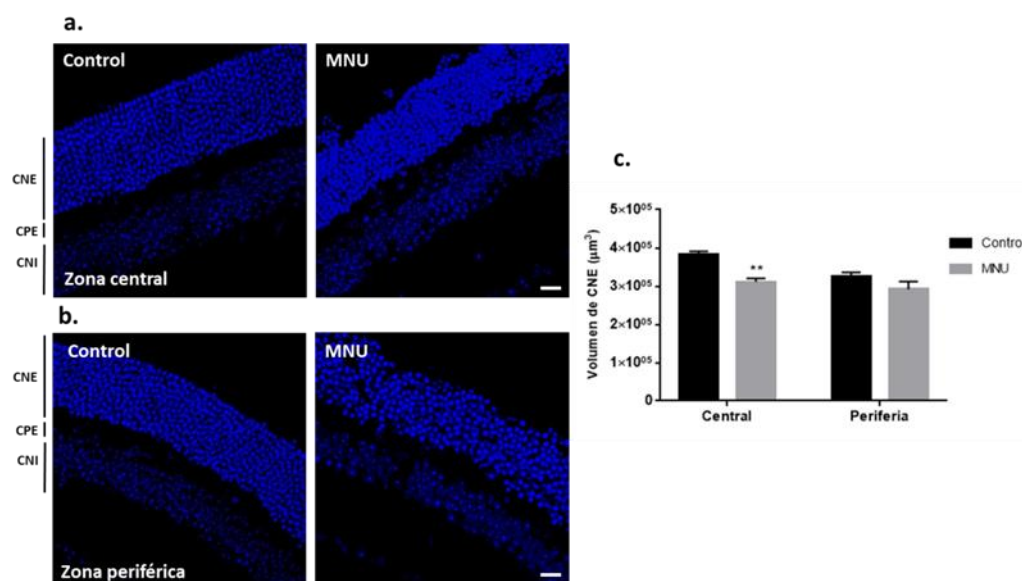
Este mismo efecto, fue observado mediante la técnica TUNEL (**Figura 4.37**). Así mismo, se llevó a cabo la inmunofluorescencia con anticuerpos de conos (Anti-Arrestina de conos) y con anticuerpos de bastones (Anti-Arrestina Visual), para así estudiar las alteraciones y pérdidas que sufren con el MNU cada uno de estos tipos celulares (**Figura 4.37**). Con el tratamiento de MNU durante 3 días, se observa un número elevado de células apoptóticas en la CNE, así como una pérdida de conos y de bastones (**Figura 4.37**). A 5 días de tratamiento, se observa una disminución a la mitad de la CNE comparada con el control, donde la mayoría de los núcleos de fotorreceptores están marcados con TUNEL. La tinción de conos y bastones a 5 días de tratamiento es prácticamente nula (**Figura 4.37**).



**Figura 4.37. Aumento de células apoptóticas en la CNE y pérdida de la tinción de conos y bastones con 3 y 5 días de tratamiento con MNU.** Tinción de DAPI (azul) y TUNEL (verde), así como inmunofluorescencia anti arrestina de conos (rojo) y anti arrestina visual (cian) de proyecciones máximas de secciones de retina C57BL/6J tratados con vehículo o con MNU durante 3 y 5 días. CNE, capa nuclear externa; CNI, capa nuclear interna; CCG, capa de células ganglionares. Barra de escala de 50 µm.

Tras los resultados obtenidos, decidimos disminuir los días de tratamiento del MNU, y estudiar la mitofagia en estadios tempranos de la degeneración (**Figura 4.38**). Con un día de tratamiento con MNU, observamos que se produce una desorganización de la capa nuclear de fotorreceptores tanto en la zona central como en la zona periférica, sin

embargo, no se observa una gran pérdida de núcleos, aunque empieza a disminuir en la zona central de la retina.

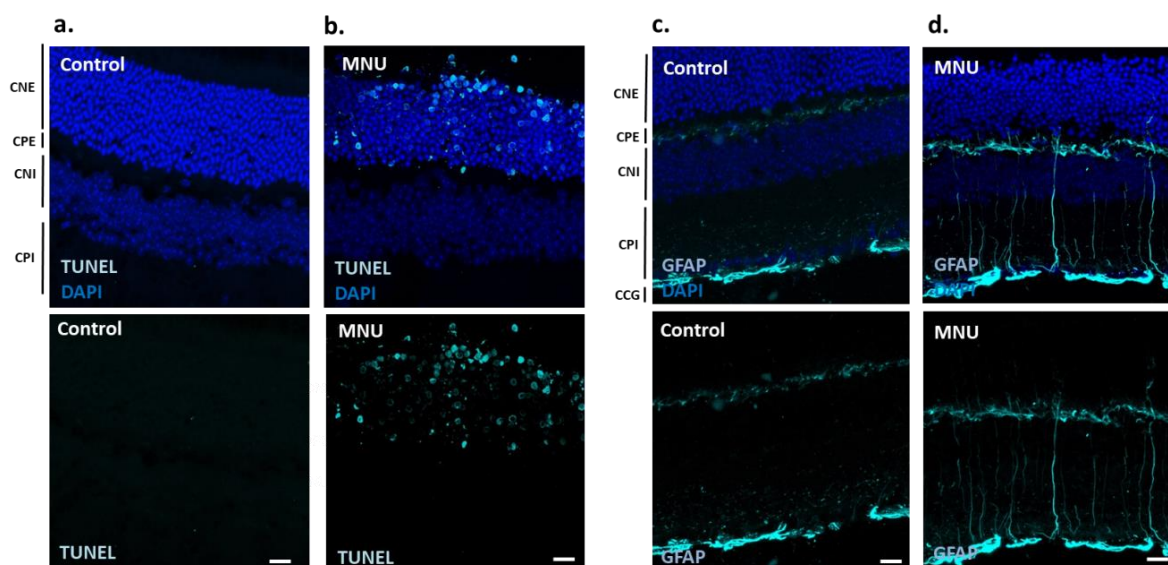


**Figura 4.38. Desorganización de la CNE y disminución de su volumen en la zona central de la retina con un día de tratamiento de MNU.** a. Proyecciones máximas de secciones de retina de ratones C57 donde se muestra la tinción con DAPI de la zona central (a.) y zona periférica (b.), tratada con vehículo (imagen izquierda) y tratada con MNU (imagen derecha). c. Cuantificación del volumen de la CNE comparando tratamientos y zonas de la retina. CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna. Se muestran las barras SEM; \*\*p<0.01. Los asteriscos son respecto al control de cada una de las zonas. Test estadístico de T-Student. Barra de escala de 50 μm.

Como los resultados son similares entre la zona central y en la zona periférica a partir de ahora solo se muestran los datos de la zona central.

A un día de tratamiento con MNU y a pesar de que no hay pérdida muy elevada de núcleos de fotorreceptores (**Figura 4.38**), ya hay marcaje positivo con TUNEL en la CNE (**Figura 4.39**). Podemos ver que la mayoría de los núcleos marcados tienen forma de anillo, que es un marcador anterior al núcleo apoptótico, mientras que en los tratamientos de 3 y 5 días son núcleos apoptóticos, con el marcaje intenso en todo el núcleo.

Otro marcador de daño que estudiamos fue la gliosis reactiva. En diversas distrofias y lesiones retinianas se produce una activación de la GM caracterizada por un aumento de la expresión de la proteína GFAP, considerada señal de identidad de gliosis reactiva. Incluso se ha postulado que la activación de la GM contribuye a la muerte de fotorreceptores [237]. Realizamos la inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-GFAP en secciones de ratones C57, observándose que con un día de tratamiento el MNU produce una activación de la glia de Müller (**Figura 4.39**).

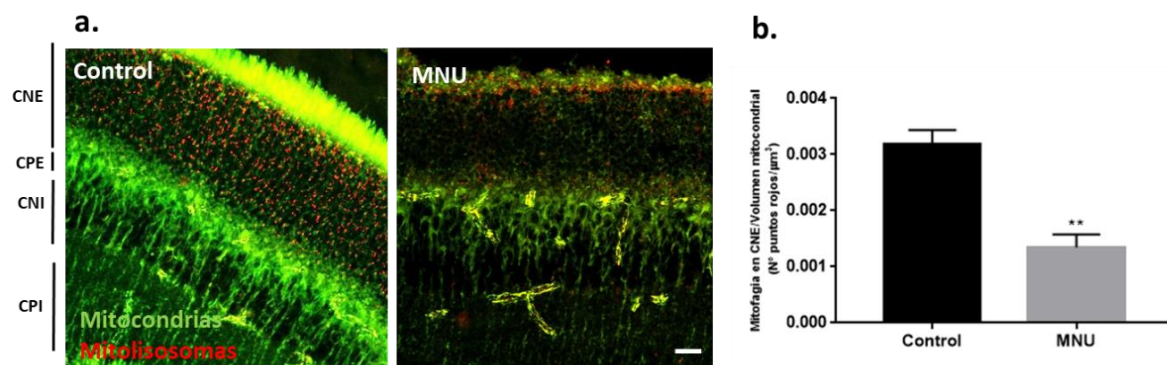


**Figura 4.39. Muerte por apoptosis en la CNE y gliosis reactiva de retinas de ratones tratados con MNU durante un día.** a. Proyecciones máximas de secciones de retina de ratones tratados con vehículo (a.) y con MNU (b.) donde se muestra la tinción con TUNEL (cian) y DAPI. Proyecciones máximas de secciones de retina de ratones tratados con vehículo (c.) y con MNU (d.) donde se muestra la tinción con GFAP (cian) y DAPI. SI, segmentos internos; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna. Barra de escala de 50  $\mu$ m.

Por tanto, el MNU a un día de tratamiento induce los primeros eventos de degeneración, y decidimos estudiar el papel de la mitofagia en la neurodegeneración de fotorreceptores en los ratones Mito-QC con un día de tratamiento.

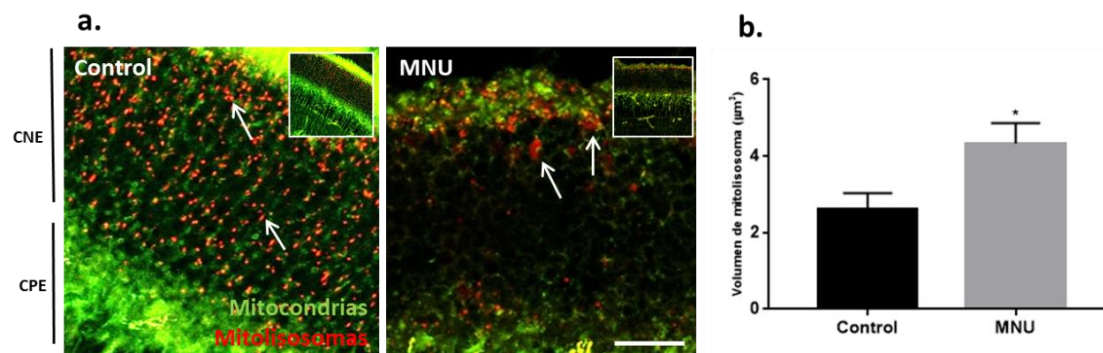
#### 4.1.4.2 *El MNU reduce la mitofagia en la CNE aunque hay una acumulación de mitofagosomas en la zona inferior de los SI y son de mayor volumen*

Para estudiar si el tratamiento con MNU modificaba la mitofagia antes de producir degeneración, inyectamos los ratones Mito-QC con MNU dejándolo actuar durante un día. Se hicieron secciones de los ojos de estos ratones y se analizaron mediante microscopía. La **figura 4.40** nos muestra que hay una disminución llamativa de mitofagia en la CNE con un día de tratamiento de MNU. Lo que nos llama la atención también, es que se pierde la mitofagia en la zona de los somas de la CNE, pero vemos acumulación de puntos rojos en la parte inferior de los SI, que nos recuerda al fenotipo que veíamos con el tratamiento de leupeptina (**Figura 4.32**),



**Figura 4.40. Disminución de los niveles de mitofagia en la CNE de retinas de ratones tratados con MNU durante un día.** **a.** Proyecciones máximas de secciones de la retina de ratones Mito-QC tratados con vehículo (imagen izquierda) y con MNU (imagen derecha) **b.** Cuantificación de los niveles de mitofagia relativizados frente al volumen mitocondrial comparando tratamientos. CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna. Se muestran las barras SEM; \*\*p<0.01. Test estadístico de *T-Student*. Barra de escala de 50  $\mu$ m.

Además, estos puntos acumulados tienen un mayor volumen que en la situación control (**Figura 4.41**).



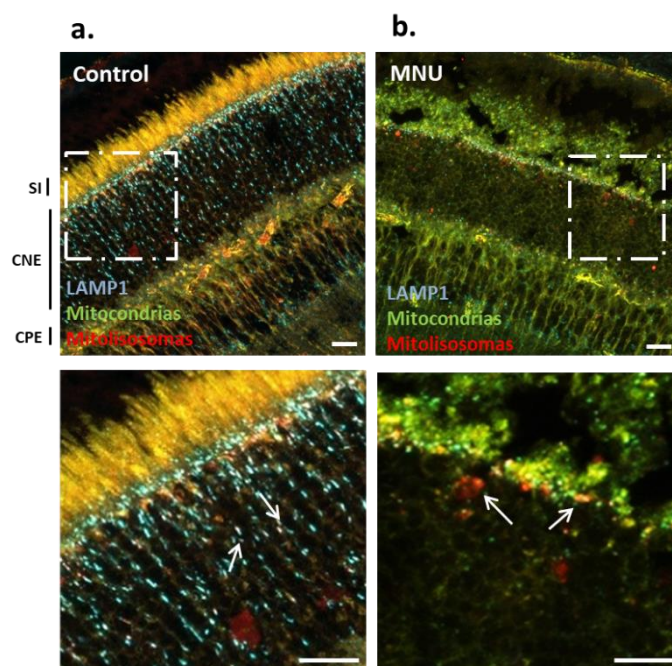
**Figura 4.41. Mitolisosomas de mayor volumen en la parte inferior de los SI de retinas de ratones tratados con MNU durante un día.** **a.** Secciones aumentadas de retina de ratones Mito-QC, de las imágenes que se muestran en la esquina superior izquierda, tratados con vehículo (imagen izquierda) y con MNU (imagen derecha). **b.** Cuantificación del volumen de los mitolisosomas comparando tratamientos. CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa. Las flechas indican mitolisosomas. Se muestran las barras SEM; \*p<0.05. Test estadístico de *T-Student*. Barra de escala de 10  $\mu$ m.

En base a estos resultados, concluimos que el MNU induce una disminución de la mitofagia en la capa de fotorreceptores tras un solo día de tratamiento con MNU.

Una de las alteraciones que hemos visto en las retinas con el tratamiento de MNU, ha sido la acumulación de mitolisosomas en la parte inferior de los SI y el aumento de su volumen (**Figuras 4.40 y 4.41**). Comprobamos si estos puntos rojos acumulados coinciden con LAMP1, y sobre todo, si ese aumento de tamaño es real o es una acumulación de mitolisosomas juntos. Para ello, se llevó a cabo una inmunofluorescencia con anti-LAMP1



en las secciones de ojo de los ratones Mito-QC tratados con MNU (**Figura 4.42**). Observamos el marcaje de LAMP1 en el mismo área donde están los puntos rojos con el tratamiento MNU (**Figura 4.42 b.**). Podemos ver que todos los puntos rojos coinciden con un resultado positivo de LAMP1. En los puntos rojos más grandes no hay acumulación de lisosomas, solo hay uno por cada punto rojo grande (**Figura 4.42 b.**).



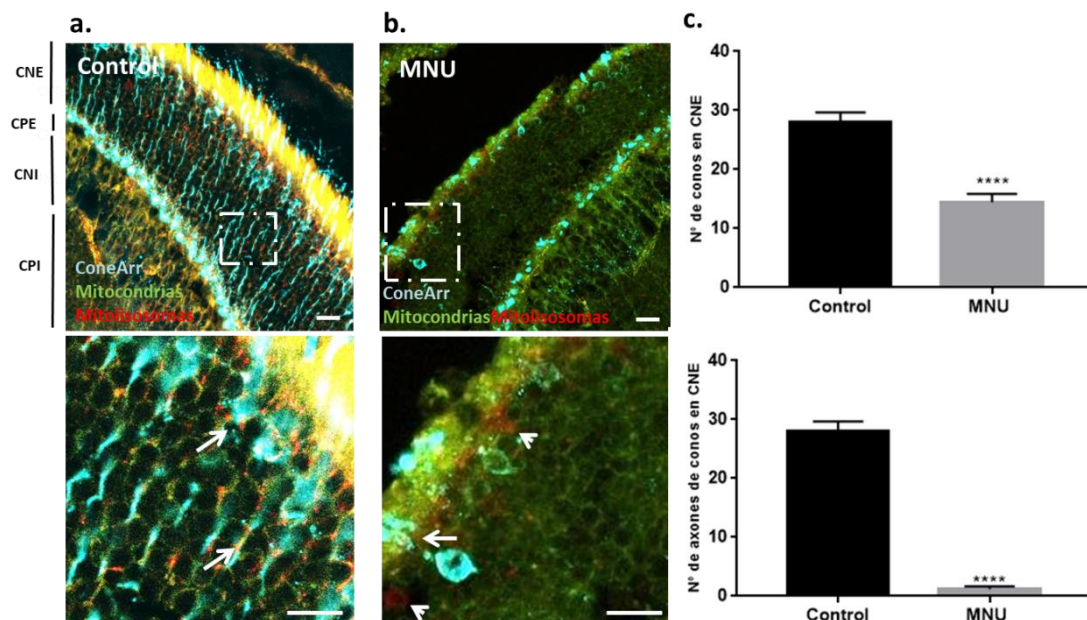
**Figura 4.42.** Los lisosomas en la retina se sitúan en la misma zona que los mitolisosomas cuando se tratan los ratones con MNU. Por cada mitolisosoma grande en las retinas de MNU solo hay un lisosoma. Proyecciones máximas de secciones de retina de ratones Mito-QC donde se muestra la inmunofluorescencia con anti-LAMP1 (cian) de la zona central, tratada con vehículo (**a.**) y tratada con MNU (**b.**) con aumento de las imágenes dentro del recuadro de cada una de las fotos que corresponden a un solo Z para observar colocalización. Las flechas indican mitolisosomas colocalizando con LAMP1. SI, segmentos internos; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa. Barra de escala de 50 y de 10  $\mu$ m.

Por tanto, concluimos que el MNU a un día produce diferentes alteraciones en la retina que llevarán a la degeneración de los fotorreceptores, y que estas alteraciones coinciden con una bajada de los niveles de mitofagia.

#### 4.1.4.3 *El MNU afecta la estructura y organización de conos, bastones y Glía de Müller, habiendo mitolisosomas en estos tipos celulares*

A continuación, investigamos en qué tipos celulares se estaba dando esa acumulación de mitolisosomas en la retina de los animales tratados con MNU. Por tanto, llevamos a cabo diferentes inmunofluorescencias utilizando anticuerpos para conos (anti-Arrestina de conos) (**Figura 4.43**), anti-Arrestina visual (**Figura 4.44**) para bastones y anti-Glutamina Sintetasa (**Figura 4.45**) para marcar la glia de Müller en las secciones de ojos de ratones Mito-QC tratados con vehículo y con MNU. En la **figura 4.43** se muestra que el MNU produce una disminución del número de conos, así como una pérdida elevada de los axones de los conos, lo que puede llevar a pensar en que el MNU produce pérdidas

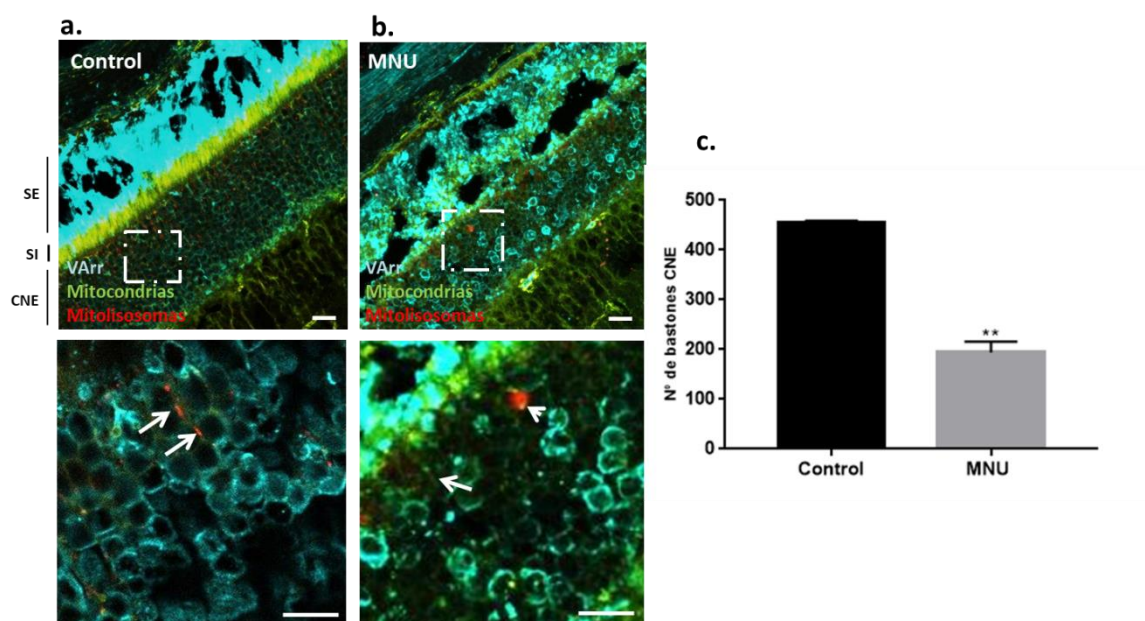
de conexiones axonales y por tanto inhibiría el transporte axonal de los lisosomas [238]. Por otro lado, algunos de los puntos rojos acumulados en la parte superior de la CNE, coinciden con el soma de los conos, pero hay algunos que no, por lo que indicaría que hay mitolisosomas acumulados también en otro tipo celular.



**Figura 4.43. Algunos de los puntos rojos acumulados con el tratamiento de MNU, coinciden con los somas de los conos. El MNU causa una disminución del número de conos y una pérdida de los axones de los conos. a.** Proyecciones máximas de secciones de retina de ratones Mito-QC donde se muestra la inmunofluorescencia con anti-Arrestina de Conos (cian) tratada con vehículo (**a.**) y tratada con MNU (**b.**) con aumento de las imágenes dentro del recuadro en los paneles **a.** y **b.** que corresponden a un solo Z para observar colocalización. **c.** Cuantificación del número de conos (arriba) y el número de axones de los conos (abajo) comparando entre tratamientos. Las flechas indican mitolisosomas colocalizando con Arrestina de Conos y las puntas de flechas indican mitolisosomas de mayor tamaño. SI, segmentos internos; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI; capa plexiforme interna. Barra de escala de 50 y 10  $\mu$ m. Se muestran las barras SEM;  $p^{****}<0.0001$ . Test estadístico T-Student.

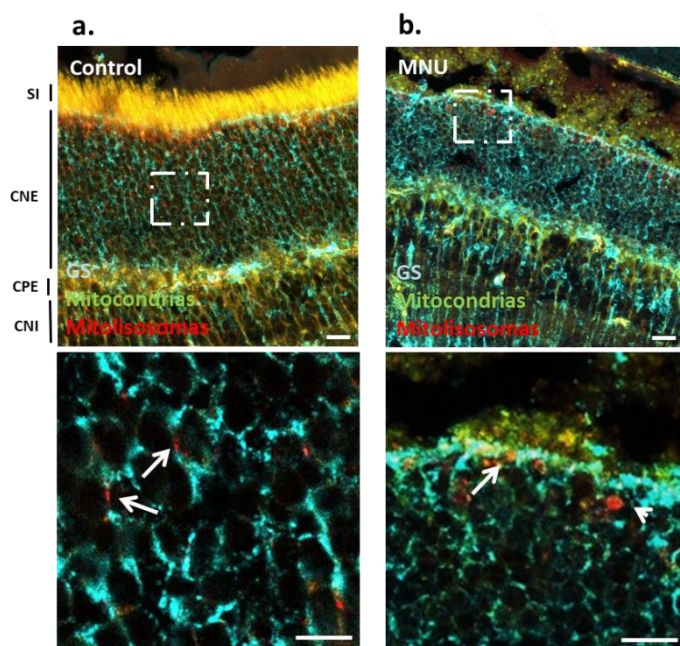
El MNU causa una desorganización tanto en el segmento interno como externo de los bastones, y hay una disminución en el número de bastones (**Figura 4.44**). Por otro lado, los mitolisosomas tanto en las retinas control como en las retinas tratadas con MNU se localizan, algunos de ellos, en los somas de los bastones al igual que ocurriría en los somas de los conos (**Figura 4.44**).





**Figura 4.44.** Algunos de los puntos rojos acumulados con el tratamiento de MNU, coinciden con los somas de los bastones en la zona más externa de la CNE. El MNU causa pérdida de bastones y desorganización de los segmentos de los bastones. **a.** Proyecciones máximas de secciones de retina de ratones Mito-QC donde se muestra la inmunofluorescencia con anti-Arrestina visual (cian) tratada con vehículo (**a.**) y tratada con MNU (**b.**) con aumento de las imágenes dentro del recuadro en los paneles a.yb. que corresponden a un solo Z para observar colocalización. Las flechas indican mitolisosomas colocalizando con Arrestina visual. Las puntas de flecha señalan mitolisosomas de mayor tamaño SE: segmentos externos; SI, segmentos internos; CNE, capa nuclear externa. Barra de escala de 50 y 10  $\mu\text{m}$ . Se muestran las barras SEM;  $p^{**}<0.01$ . Test estadístico T-Student.

En relación con lo anterior, queríamos comprobar si algunos de estos mitolisosomas se encuentran en la GM, y que si ésta, ante el daño provocado por el MNU, aumenta su presencia en la retina como respuesta al daño (**Figura 4.45**). En la **figura 4.45** se muestra como también algunos mitolisosomas coinciden con la GM, tanto en las retinas control como las de MNU. Por otro lado, parece que en las retinas con MNU, la glía se dispone más alrededor de los núcleos de los FR.



**Figura 4.45.** Algunos de los puntos rojos acumulados con el tratamiento de MNU se encuentran en la Glia de Müller. En las retinas con MNU, la GM rodea los núcleos de los FR. **a.** Proyecciones máximas de secciones de retina de ratones Mito-QC donde se muestra la inmunofluorescencia con anti-Glutamina Sintetasa (cian) tratada con vehículo (**a.**) y tratada con MNU (**b.**) con aumento de las imágenes dentro del recuadro en los paneles a.y b. que corresponden a un solo Z para observar colocalización. Las flechas indican mitolisosomas colocalizando con Glutamina Sintetasa. Las puntas de flecha indican mitolisosomas de mayor tamaño. SE: segmentos externos; SI, segmentos internos; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna. Barra de escala de 50 y 10  $\mu\text{m}$ .

Concluimos por tanto que los mitolisosomas que se encuentran tanto en las retinas control como los acumulados en las retinas tratadas con MNU, están tanto en conos, como en bastones como en la glía de Müller, y que estos tipos celulares se ven afectados por el MNU disminuyendo su número, cambiando su conformación y organización o perdiendo los axones como en el caso de los conos.

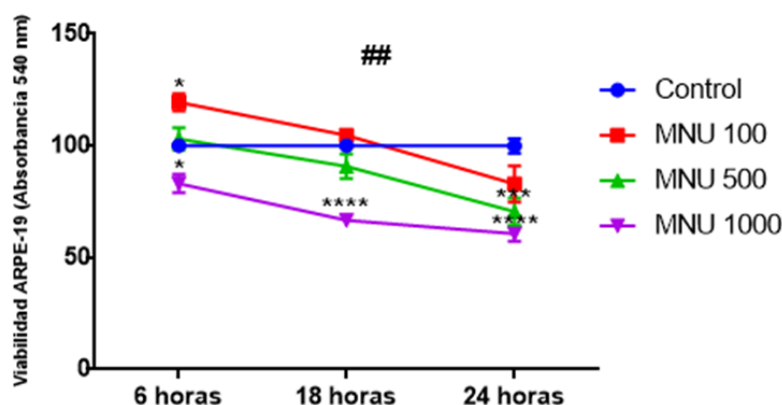
#### 4.1.5 Mecanismo molecular por el que el MNU modula la mitofagia

En los resultados anteriores hemos visto que el MNU produce una inhibición de la mitofagia en la capa de fotorreceptores de la retina. No se conoce con detalle el mecanismo molecular por el que el MNU actúa [204], se conoce que produce estrés oxidativo [201], [202] y que induce daño en las mitocondrias [202]. Es por ello, que nos preguntamos cuál es el mecanismo por el que actúa y si bloquea la vía de mitofagia dependiente de PINK1/Parkin y/o la vía dependiente de NIX/Bnip3, o ambas.

##### 4.1.5.1 El MNU induce muerte celular, daño en el DNA y cambios en la morfología de algunos orgánulos esenciales en las células ARPE-19

Utilizamos células ARPE-19, una línea no transformada derivada del epitelio pigmentario que expresan de manera estable el reportero Mito-QC (apartado 3.1.2.3 de materiales y métodos).

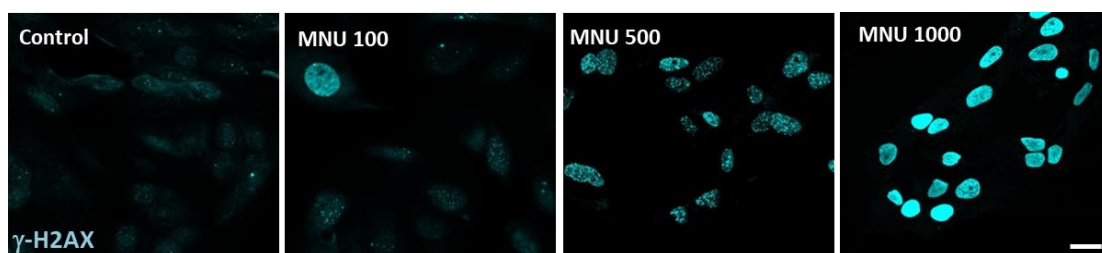
En primer lugar, realizamos una cinética dosis-respuesta tratando durante diferentes tiempos (6, 18 y 24 horas) con el objetivo de estudiar más detalladamente la cinética de muerte inducida por el MNU. Se utilizaron tres dosis de MNU, una baja (100  $\mu\text{g/ml}$ ), una media (500  $\mu\text{g/ml}$ ) y una alta (1000  $\mu\text{g/ml}$ ), y se analizó mediante el test de viabilidad cristal violeta (**Figura 4.46**). Según estos resultados, las células ARPE-19 son dependientes tanto de la dosis como del tiempo de tratamiento. A tiempo de 6 horas, la dosis de 1000  $\mu\text{g/ml}$  lleva a una muerte significativa de las células. A tiempo de 18 horas de tratamiento ocurre lo mismo que a 6 horas, sin embargo, al tiempo de 24 horas, ya con la dosis de 500  $\mu\text{g/ml}$  observamos una muerte significativa. También, en la **figura 4.46**, hay una mayor viabilidad a 6 horas con el tratamiento de MNU a la dosis de 100  $\mu\text{g/ml}$  con respecto al control, que esto nos lleva a pensar en un mecanismo de compensación de supervivencia ante un daño menor.



**Figura 4.46. Las células ARPE-19 son dependientes de dosis de MNU y tiempo de tratamiento.** Cuantificación mediante la absorbancia de cristal violeta de la viabilidad de las células ARPE-19 comparando diferentes tiempos (6, 18 y 24 horas) y diferentes dosis de MNU (100, 500 y 1000  $\mu\text{g/ml}$ ). Los asteriscos (\*) indican la significancia con respecto a su control del mismo tiempo. Las almohadillas (#) indican que la interacción entre tiempo y dosis es significativa. Los valores están relativizados con el control a 6 horas, poniendo el valor 100 al control de 6 horas. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Se muestran las medias + SEM. Test estadístico de ANOVA de dos vías.

Como segundo factor, estudiamos el daño al DNA que produce el MNU antes de la apoptosis [204]. Para ello, se llevó a cabo la inmunofluorescencia de  $\gamma\text{-H2AX}$ , que marca la rotura de hebras dobles de ADN en las células ARPE-19 Mito-QC (**Figura 4.47**) tratadas con las diferentes dosis de MNU. Observamos que el daño en el DNA en las células ARPE-19 Mito-QC aumenta con la dosis de MNU, viendo a la dosis de 100  $\mu\text{g/ml}$  alguna célula con el núcleo marcado, a la dosis de 500  $\mu\text{g/ml}$  todos los núcleos de las células marcadas

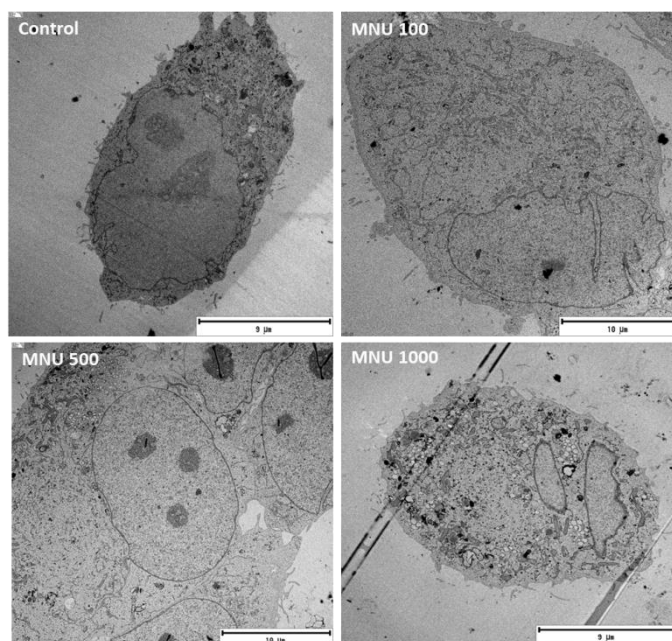
pero con un marcaje en forma de loci, y a la dosis de 1000, todos los núcleos con un marcaje intenso (**Figura 4.47**).



**Figura 4.47. El daño al DNA va aumentando en función de la dosis de MNU en las células ARPE-19 Mito-QC.** Proyecciones máximas de células ARPE-19 donde se muestra la inmunofluorescencia con  $\gamma$ -H2AX tratadas con las diferentes dosis de MNU (100  $\mu\text{g/ml}$ , 500  $\mu\text{g/ml}$  y 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 18 horas. Barras de escala 25  $\mu\text{m}$ .

Para tener una visión general de cómo el MNU altera a las células, realizamos un estudio mediante ultramicroscopía. Tratamos las células ARPE-19 con las diferentes dosis de MNU y las observamos al microscopio electrónico (**Figura 4.48-52**).

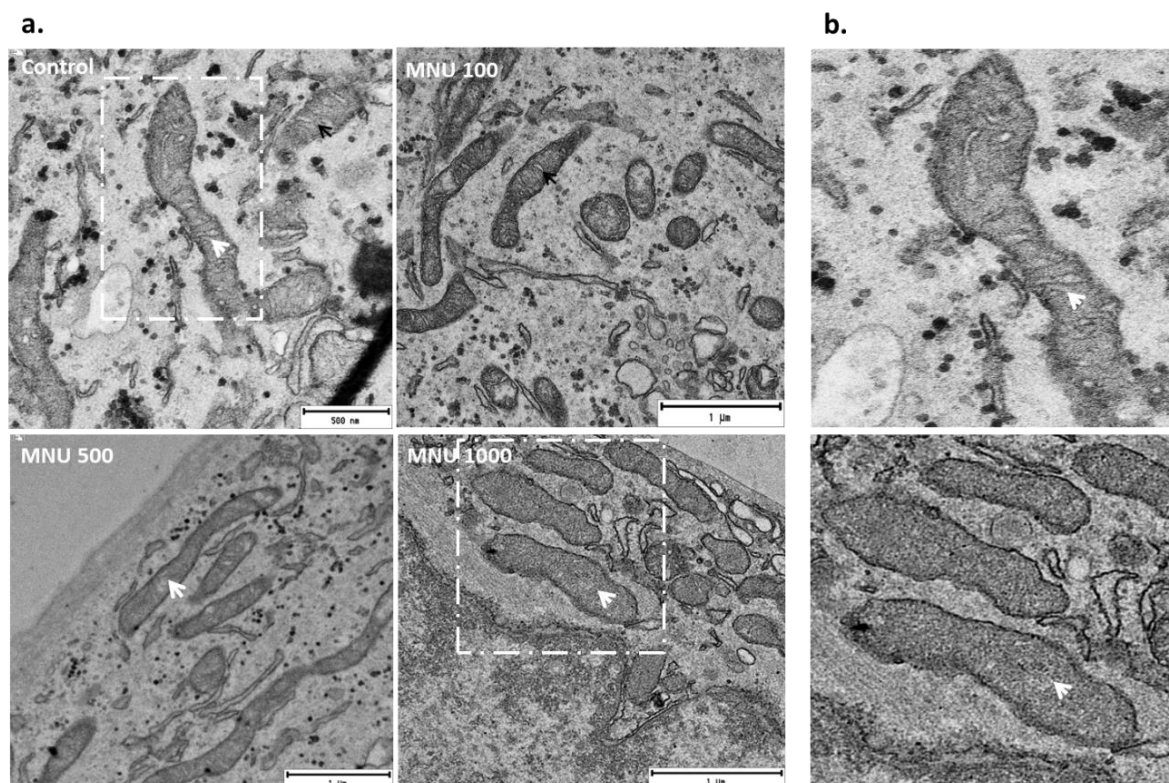
Las células tratadas con MNU a 500  $\mu\text{g/ml}$  presentan zonas donde se ven acumulaciones de orgánulos si lo comparamos con el control (**Figura 4.48**). Así mismo, al igual que se observan acumulaciones, se encuentran zonas vacías de orgánulos, no como en el control que se observa una distribución por todo el citoplasma de los orgánulos. A la dosis de 1000  $\mu\text{g/ml}$  de MNU la célula está mucho más perjudicada, aumenta la desorganización y parece que todo está mucho más dañado.



**Figura 4.48. Con la dosis de 500  $\mu\text{g/ml}$  se producen acumulaciones de orgánulos a la vez que zonas vacías. Con la dosis de 1000  $\mu\text{g/ml}$  el citoplasma y los orgánulos están más desorganizados y dañados.** Imágenes tomadas al microscopio electrónico de células ARPE-19 tratadas con diferentes dosis de MNU durante 18 horas. Barras de escala de 9 y 10  $\mu\text{m}$ .



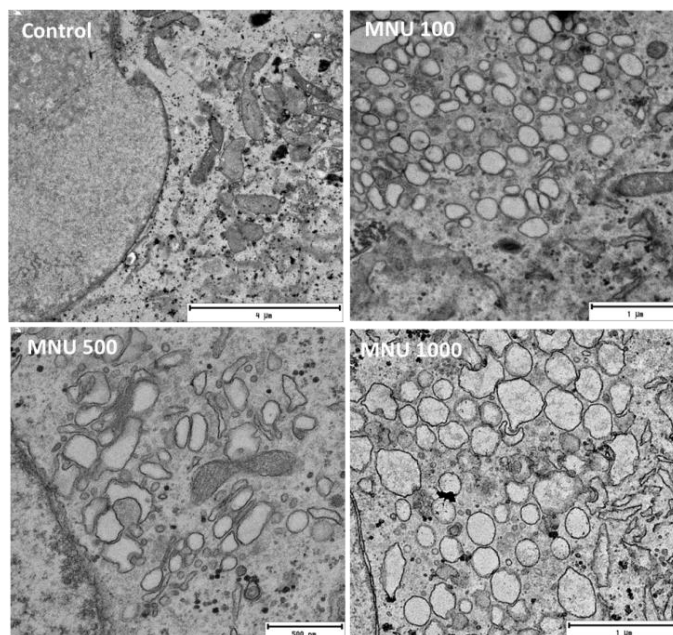
Las mitocondrias también se ven afectadas por el MNU (**Figura 4.49**). Las crestas de la membrana interna de las mitocondrias empiezan a perder consistencia con la dosis de 500  $\mu\text{g/ml}$  de MNU. A la dosis de 1000  $\mu\text{g/ml}$  de MNU, estas crestas son prácticamente inapreciables y las mitocondrias se presentan engrosadas.



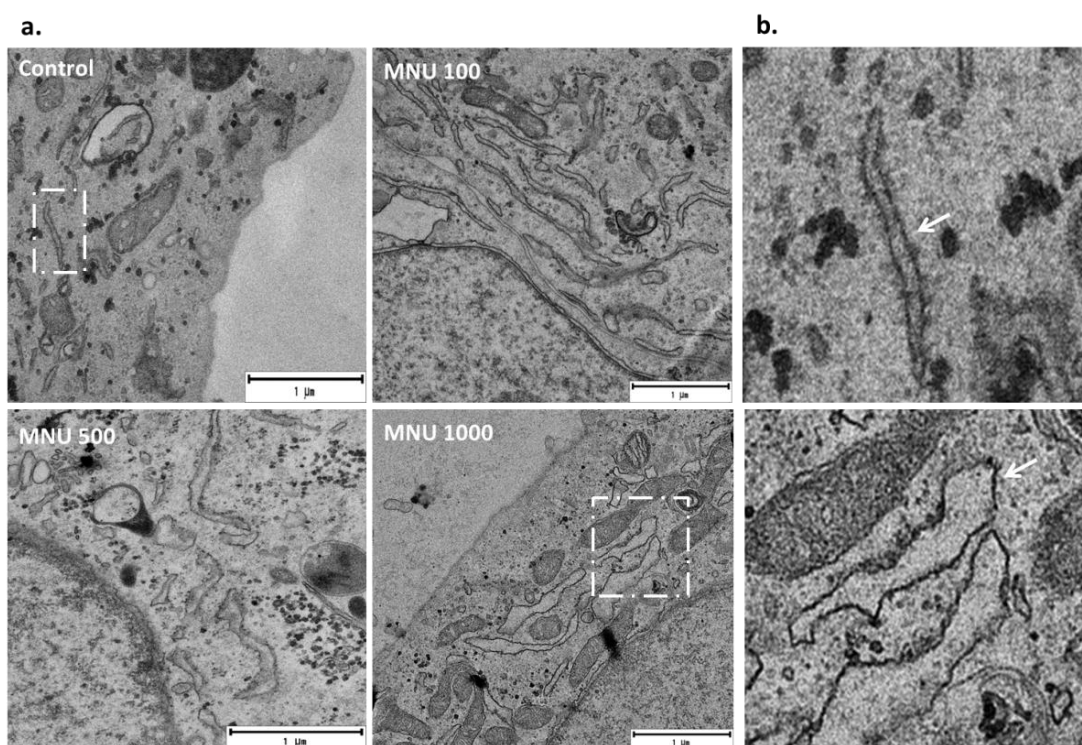
**Figura 4.49.** Las mitocondrias con la dosis de MNU de 500  $\mu\text{g/ml}$  pierden la integridad de las crestas de la membrana interna. A la dosis de 1000  $\mu\text{g/ml}$  las crestas desaparecen y las mitocondrias están engrosadas. **a.** Imágenes tomadas al microscopio electrónico donde se muestran las mitocondrias de células ARPE-19 tratadas con diferentes dosis de MNU durante 18 horas. **b.** Aumento de las imágenes en el recuadro en el panel **a.** donde se muestran las mitocondrias con más detalle. Las flechas señalan las crestas mitocondriales. Barras de escala de 500 nm y 1  $\mu\text{m}$ .

Un aspecto bastante destacable de las consecuencias del MNU es que ya a partir de la dosis más pequeña (100  $\mu\text{g/ml}$ ) las células ARPE-19 presentan un citoplasma vacuolizado, que va aumentando según incrementa la dosis de MNU (**Figura 4.50**).

**Figura 4.50.** La vacuolización del citoplasma de las células ARPE-19 va aumentando en función de la dosis de MNU. Imágenes tomadas al microscopio electrónico de células ARPE-19, donde se muestra la vacuolización del citoplasma, tratadas con diferentes dosis de MNU durante 18 horas. Barras de escala de 500 nm y 1  $\mu$ m.



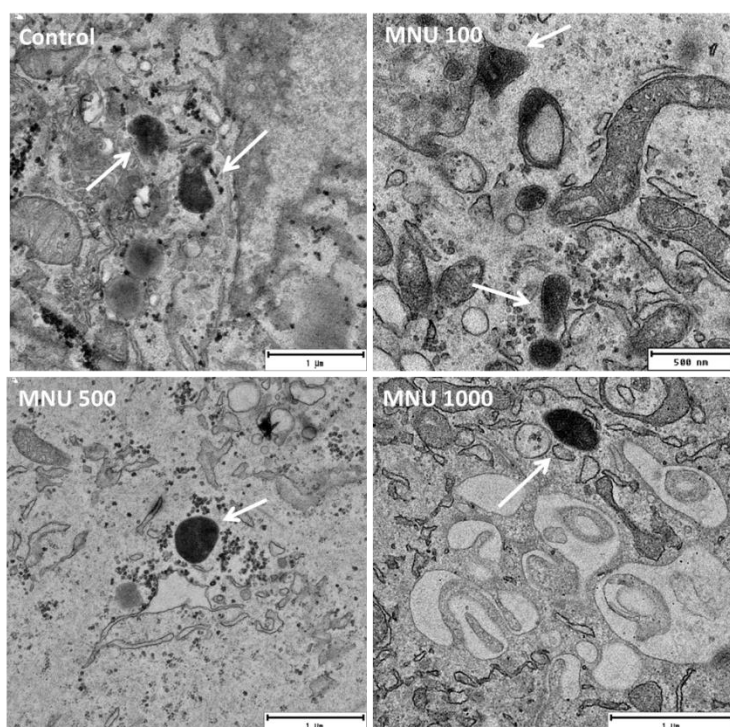
En la **figura 4.51** se muestra como el retículo endoplasmático adquiere un aspecto engrosado y deformado a partir de la dosis de 500  $\mu$ g/ml de MNU, siendo a la dosis de 1000  $\mu$ g/ml muy llamativo.



**Figura 4.51.** El retículo endoplasmático engrosa a partir de la dosis de 500  $\mu$ g/ml de MNU. **a.** Imágenes tomadas al microscopio electrónico donde se muestra el retículo endoplasmático de células ARPE-19 tratadas con diferentes dosis de MNU durante 18 horas. **b.** Aumento de las imágenes en el recuadro en el panel **a.** donde se muestra el retículo endoplasmático con más detalle. Las flechas señalan el retículo endoplasmático. Barra de escala de 1  $\mu$ m.



Nos sorprendió que al analizar por microscopía electrónica los lisosomas no se veían cambios aparentes en las células tratadas con MNU (**Figura 4.52**).



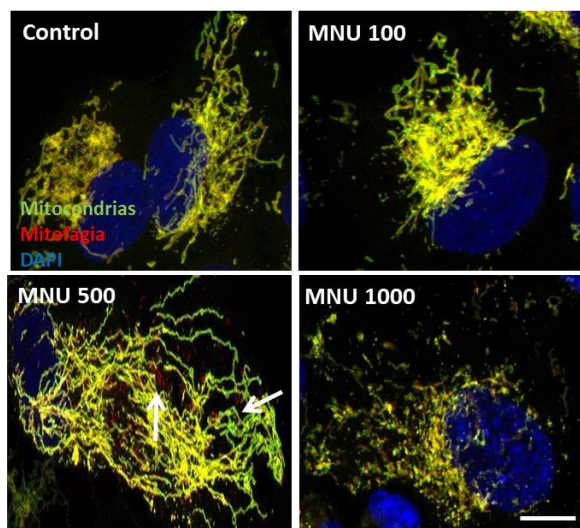
**Figura 4.52.** No se aprecian cambios aparentes en los lisosomas de las células tratadas con MNU. Imágenes tomadas al microscopio electrónico de células ARPE-19, donde se muestran los lisosomas, tratadas con diferentes dosis de MNU durante 18 horas. Las flechas señalan lisosomas. Barras de escala de 500 nm y 1 µm.

En vista de estos resultados, el MNU provoca cambios en la morfología de algunos orgánulos esenciales, así como vacuolización del citoplasma.

#### **4.1.5.2 El MNU induce mitofagia a dosis bajas y la inhibe a dosis altas por un posible cambio en el pH lisosomal**

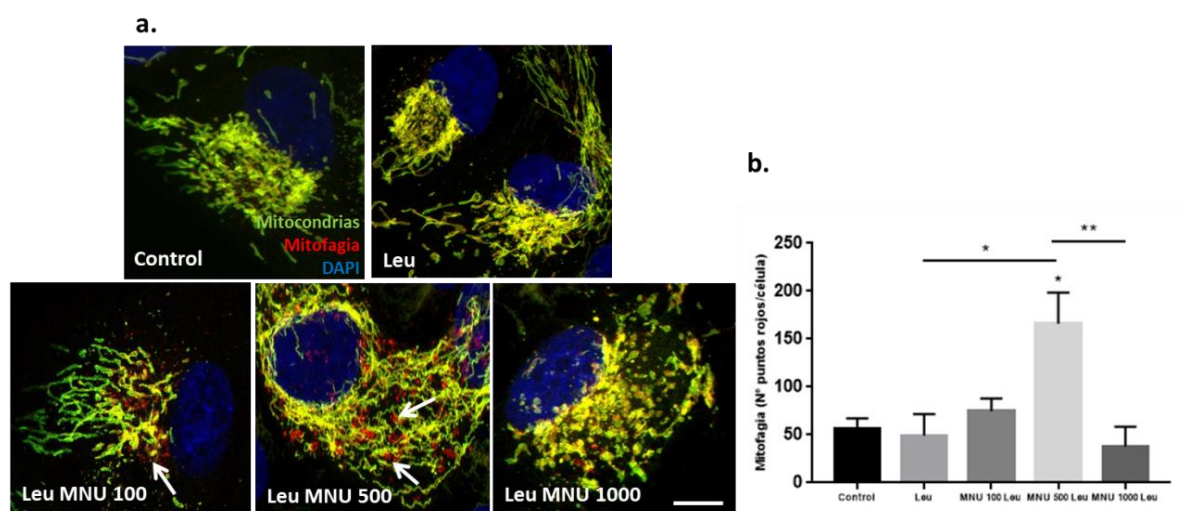
Con respecto a la mitofagia, también realizamos una cinética dosis-respuesta durante 18 horas con el objetivo de estudiar más detalladamente la cinética de la mitofagia inducida por el MNU. Se utilizaron las tres dosis de MNU (100, 500 y 1000 µg/ml) y se analizó mediante microscopía la formación de puntos rojos representativos de mitofagia (**Figura 4.53**). A la dosis de 100 µg/ml no hay cambios aparentes con respecto al control. Sin embargo, vemos un aumento de puntos rojos a la dosis de MNU de 500 µg/ml con respecto al control. A la dosis de 1000 µg/ml el número de puntos rojos disminuye. Estos datos sugieren que el MNU induce mitofagia a dosis bajas y que inhibe a dosis altas durante un tratamiento de 18 horas.





**Figura 4.53.** Hay un pico de mitofagia a dosis medias de MNU, la cual luego se inhibe a dosis altas. Proyecciones máximas de células ARPE-19 Mito-QC comparando diferentes dosis de MNU (100  $\mu\text{g/ml}$ , 500  $\mu\text{g/ml}$  y 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) respecto al control durante 18 horas. Las flechas indican mitolisosomas. Barra de escala de 10  $\mu\text{m}$ .

Para comprobar estos datos, lo que hicimos fue bloquear la degradación en los lisosomas con leupeptina, para medir el flujo de mitofagia. Tratamos las células ARPE-19 Mito-QC durante 18 horas con leupeptina y las analizamos mediante microscopia (**Figura 4.54**). Inhibiendo con leupeptina, podemos observar claramente el pico de mitofagia en la dosis de 500  $\mu\text{g/ml}$  de MNU (**Figura 4.54**). Sin embargo, la inhibición del flujo nos permite ver que a la dosis de MNU de 100  $\mu\text{g/ml}$  ya hay una tendencia de incremento de la mitofagia con respecto al control, por lo que es posible que ante un daño, la mitofagia esté actuando como un mecanismo neuroprotector hasta cierto límite de daño como puede ser la dosis de 1000  $\mu\text{g/ml}$ , donde se muestra que los niveles de mitofagia descienden hasta llegar a niveles más bajos que los del control.

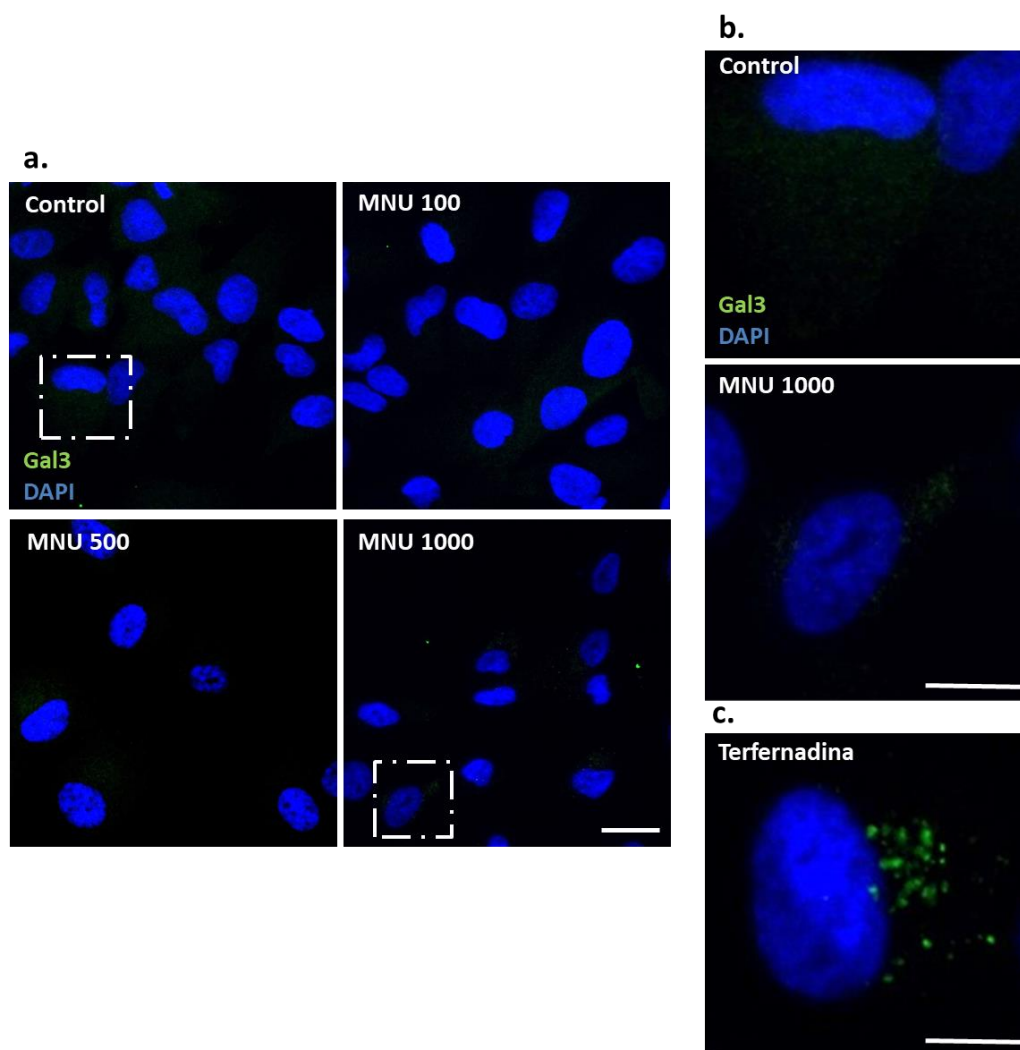


**Figura 4.54.** Hay pico de mitofagia con la dosis de 500 µg/ml de MNU, que desciende por niveles menores a los del control a la dosis alta. **a.** Proyecciones máximas de células ARPE-19 Mito-QC comparando diferentes dosis de MNU (100 µg/ml, 500 µg/ml y 1000 µg/ml) respecto al control habiendo inhibido el flujo con leupeptina durante 18 horas. **b.** Cuantificación de mitofagia comprando tratamientos. Las flechas indican mitolisosomas. Se muestran las barras SEM.  $p^* < 0.05$ ;  $p^{**} < 0.001$ . Test estadístico de Mann-Whitney. Barra de escala de 10 µm.

Ya que hemos visto que el MNU induce mitofagia a dosis bajas y la bloquea a dosis altas, nos planteamos si a estas últimas puede tener un efecto de bloqueo en la actividad lisosomal, aunque no veamos cambios en la morfología (**Figura 4.52**), es posible que los haya a nivel funcional. Los lisosomas se definen como orgánulos delimitados por una membrana y un interior a pH ~ 4.5, en el cual se encuentran las proteasas lisosomales como las catepsinas, que actúan a pH ácido [239]. La permeabilización de la membrana del lisosoma (LMP) es una perturbación de la membrana que induce la liberación de las enzimas del lumen al citosol. Curiosamente, los lisosomas no cambian su morfología durante el LMP. Además, LMP ha sido estudiado recientemente debido a que las catepsinas pueden desencadenar la muerte celular a través de las caspasas. Para obtener más información sobre el daño lisosomal realizamos una tinción de galectina-3. Las galectinas son proteínas con alta afinidad por los azúcares β-galactósidos [240]. Las galectinas generalmente se presentan en el citosol de una manera difusa, pero cuando los lisosomas se permeabilizan, pueden entrar en los lisosomas y unirse a los azúcares β-galactósidos presentes en la membrana del lisosoma y presentar un punteado.

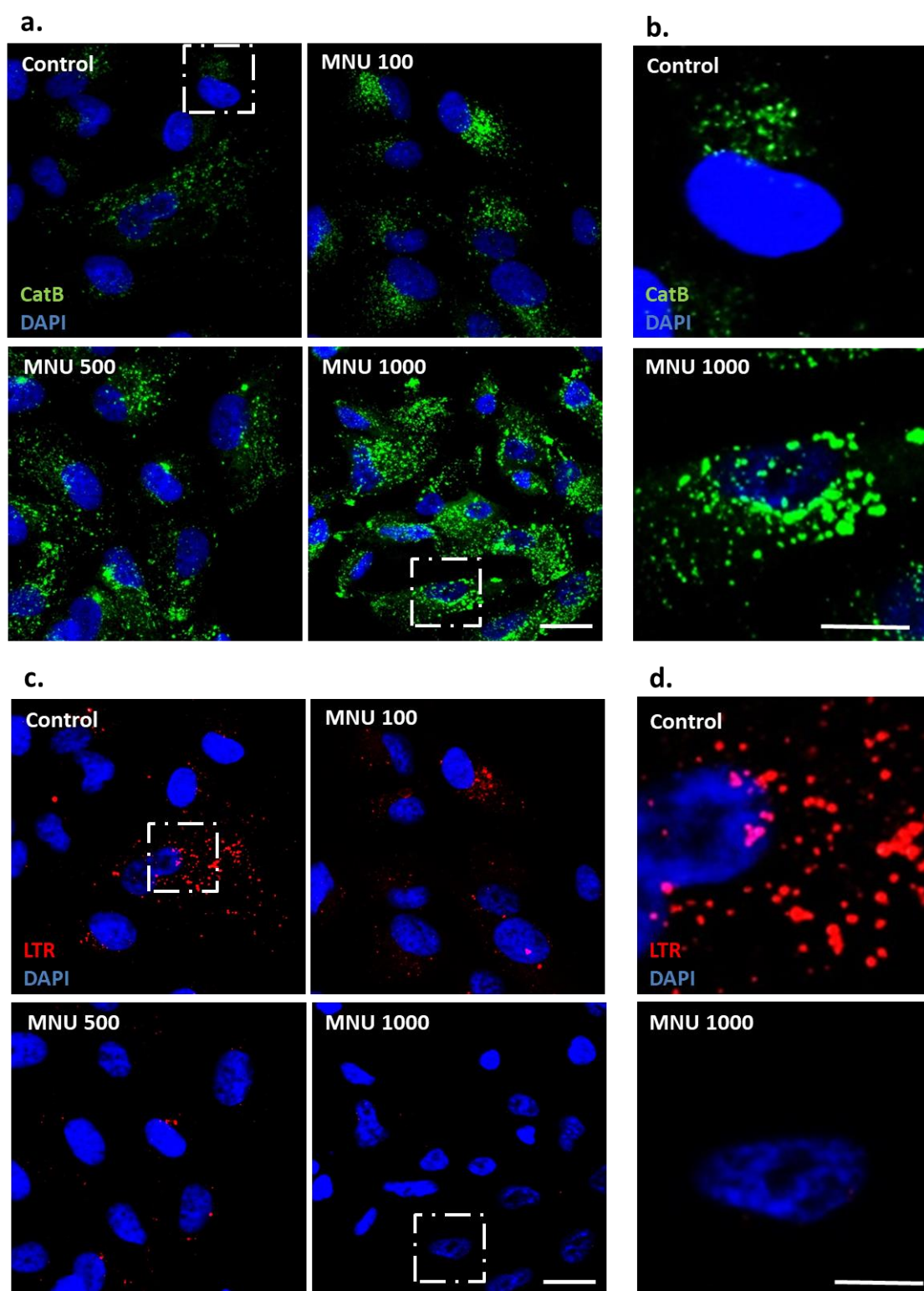
En las células ARPE tratadas con las diferentes dosis de MNU durante 18 horas, la galectina-3 permanecía difusa (**Figura 4.55 a-b**), por lo que es indicativo que el MNU no induce LMP. Como control positivo de LMP se trataron las células con Terfernadina, un

medicamento anfifílico catiónico bien conocido por inducir LMP en líneas celulares, con el cual observamos el marcaje punteado de Galectina-3 (**Figura 4.55 c**).



**Figura 4.55. El MNU mantiene un marcaje difuso de Galectina-3.** **a.** Proyecciones máximas de células ARPE-19 donde se muestra la tinción con Galectina-3. **b.** Aumento de las imágenes en recuadro del panel a. **c.** Proyección máxima de una célula ARPE-19 con tinción de Galectina-3 tratada con Terfernadina (8  $\mu$ M). Barras de escala de 25 y 10  $\mu$ m.

Al igual que las catepsinas, en condiciones normales se encuentran en el interior de los lisosomas, pero cuando hay LMP, puede perderse su marcaje punteado. Para estudiar el estado de los lisosomas, lo que hicimos en primer lugar fue una inmunofluorescencia anti-Catepsina B y una tinción con Lisotracker Red, que es una sonda fluorescente que se acumula dentro de orgánulos ácidos de manera pH dependiente (**Figura 4.56**). Observamos que a medida que la dosis de MNU aumenta, la catepsina B se acumula, los puntos son más gruesos. Por el contrario, el LTR disminuye con el aumento de la dosis de MNU, lo que indicaría que el pH no es ácido.



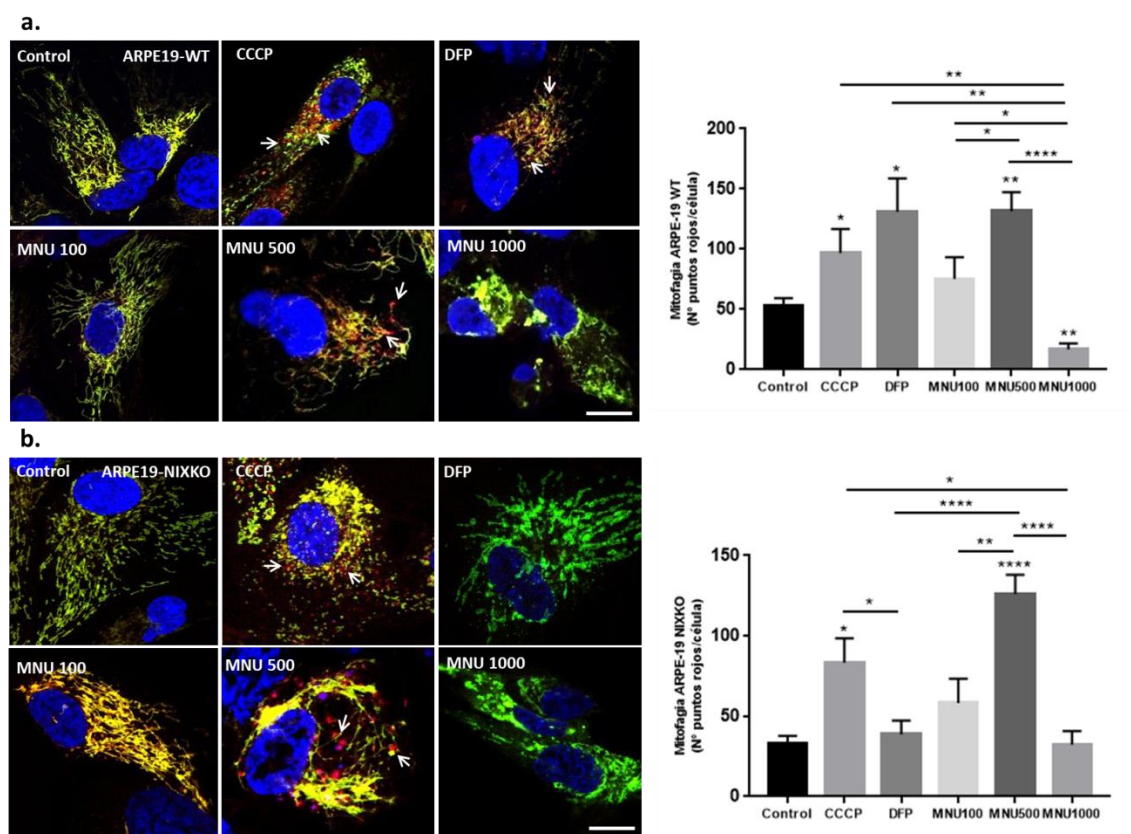
**Figura 4.56.** El MNU provoca una disminución del marcaje de LTR y aumento de la tinción para la catepsina B. Proyecciones máximas de células ARPE-19 donde se muestra la inmunofluorescencia con CatepsinaB (a.) y- la tinción con LTR (c.). Aumento de las imágenes en recuadro del panel a. (b.) y del panel c. (d.). Barras de escala de 25 y 10  $\mu$ m.

Esto es indicativo de que los lisosomas están dañados, pero no que es LMP, sin embargo, podemos pensar que lo que está sucediendo es una variación del pH de los lisosomas por parte del MNU.

### **4.1.5.3**      *El MNU modula la mitofagia a través de la vía dependiente de PINK1/Parkin*

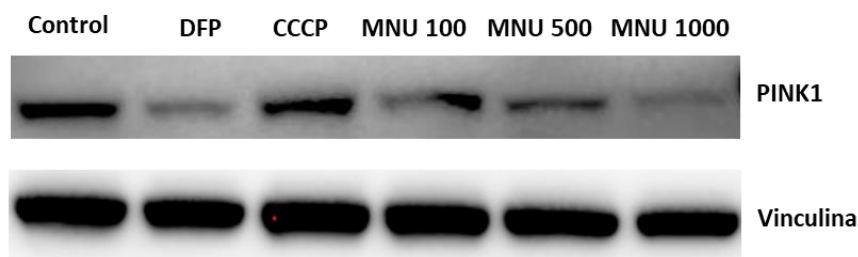
Queríamos saber cuál era la vía de mitofagia regulada por MNU, y para ello, estudiamos las dos vías principales de mitofagia: NIX/Bnip3 y PINK1/Parkin. En primer lugar, utilizamos las células ARPE-19 Mito-QC y las células ARPE-19 Mito-QC NIX KO, tratándolas con las diferentes dosis de MNU utilizadas anteriormente (100, 500 y 1000 µg/ml) durante 18 horas, estudiando las variaciones de mitofagia en una línea y otra. Se trataron también con CCCP y DFP como controles de inducción de mitofagia (**Figura 4.57**). Como se muestra en la **figura 4.57 b.**, el MNU en las células ARPE-19 Mito-QC NIXKO induce mitofagia a la dosis de 500 µg/ml y disminuye a la dosis de 1000 µg/ml, por lo tanto, si modula la mitofagia, no actúa por la proteína NIX, por lo que la mitofagia modulada por MNU no es dependiente de NIX/Bnip3. Las células ARPE-19 Mito-QC NIXKO tratadas con CCCP presentan puntos rojos, pero no las tratadas con DFP, ya que DFP induce mitofagia vía NIX/Bnip3 (**Figura 4.57 b**).





**Figura 4.57. El MNU modula la mitofagia en las células ARPE-19 NIX KO.** **a.** Proyecciones máximas de células ARPE-19 Mito-QC WT (**a.**) y NIX KO (**b.**) con diferentes tratamientos y sus respectivas cuantificaciones de mitofagia. Las flechas indican mitolisosomas. Se muestran las barras SEM.  $p^* < 0.05$ ;  $p^{**} < 0.01$ ;  $p^{***} < 0.0001$ . Test estadísticos de T-Student y de Mann-Withney. Barras de escala de 10  $\mu$ m.

En función de estos resultados, planteamos estudiar la vía de mitofagia dependiente de PINK1/Parkin. Para ello hicimos un Western Blot para ver si el MNU estabilizaba PINK1 al tratar las células ARPE-19 (**Figura 4.58**). Observamos que PINK1 a la dosis de MNU DE 1000  $\mu$ g/ml, empieza a desaparecer, lo que podría indicar que el MNU a dosis altas desestabiliza PINK1, y por lo tanto, se inhibe la mitofagia, por lo que nos daría la idea de que MNU modula la mitofagia mediante la vía dependiente de PINK1/Parkin.



**Figura 4.58. PINK1 se desestabiliza en las células ARPE-19 con MNU a 1000  $\mu$ g/ml.** **a.** Se representa la detección de PINK1 en células ARPE-19 con diferentes tratamientos aplicados durante 18 horas. Se utiliza Vinculina como control.



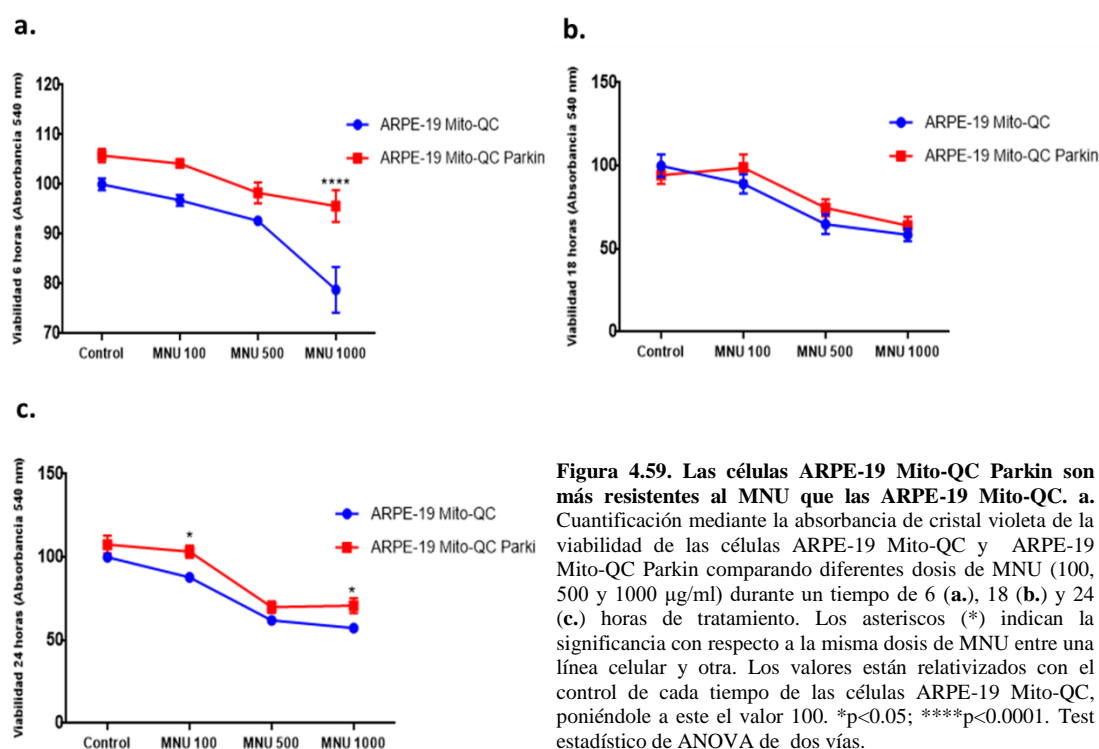
Por tanto, proponemos que el MNU modula la mitofagia por la vía dependiente de PINK1/Parkin.

### 4.1.6 Papel neuroprotector de la mitofagia en la degeneración de fotorreceptores

Una vez hecho el estudio de cómo afecta el MNU a los fotorreceptores, a la mitofagia presente en estos y cómo actúa el MNU, llevamos a cabo el estudio del posible papel neuroprotector de la mitofagia en la degeneración de los fotorreceptores que cursa el MNU.

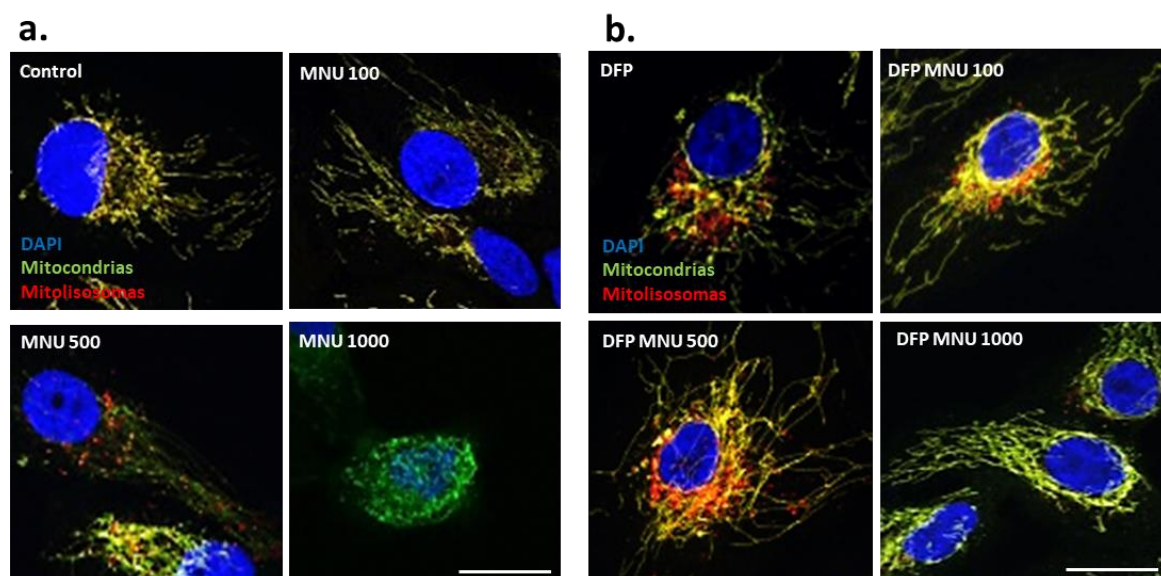
#### 4.1.6.1 *Un incremento de mitofagia protege las células del daño provocado por el MNU*

En primer lugar, hicimos un estudio exploratorio de la viabilidad de las células ARPE-19 Mito-QC comparadas con la viabilidad de las células ARPE-19 Mito-QC con Parkin sobreexpresada. Esto nos permitía estudiar si un incremento de la mitofagia preservaba la viabilidad de las células ante un daño provocado por el MNU. Este estudio lo llevamos a cabo midiendo la absorbancia mediante cristal violeta (**Figura 4.59**). Una sobreexpresión de Parkin en las células ARPE-19 Mito-QC conlleva a una mayor resistencia al efecto del MNU. Como vemos en la **figura 4.59**, en el tiempo de 6 horas a la mayor dosis de MNU, las células con Parkin sobreexpresada permanecen como el control, sin embargo, las células sin Parkin sobreexpresada cae su viabilidad. Al tiempo de tratamiento de 18 horas, sin embargo, no se aprecian cambios, pero en el tratamiento de 24 horas, podemos ver como la sobreexpresión de Parkin mantiene un número mayor de células vivas.



Esto sugiere que la sobreexpresión de Parkin resulta en una mayor activación de la vía de mitofagia dependiente de PINK1/Parkin y que esto favorezca la supervivencia de las células ARPE-19.

Por otro lado, tratamos las células ARPE-19 con las diferentes dosis de MNU y al mismo tiempo con DFP, para producir un incremento de mitofagia y ver si mantenía las células en mejor estado de viabilidad ante el daño provocado. Lo que observamos es que el DFP protegía a las células ARPE-19 ante el daño del MNU en las diferentes dosis (**Figura 4.60**), aunque a la dosis de 1000 µg/ml ya empiezan a acumularse las mitocondrias, pero están mejor que las células tratadas con la dosis de 1000 µg/ml sin DFP.

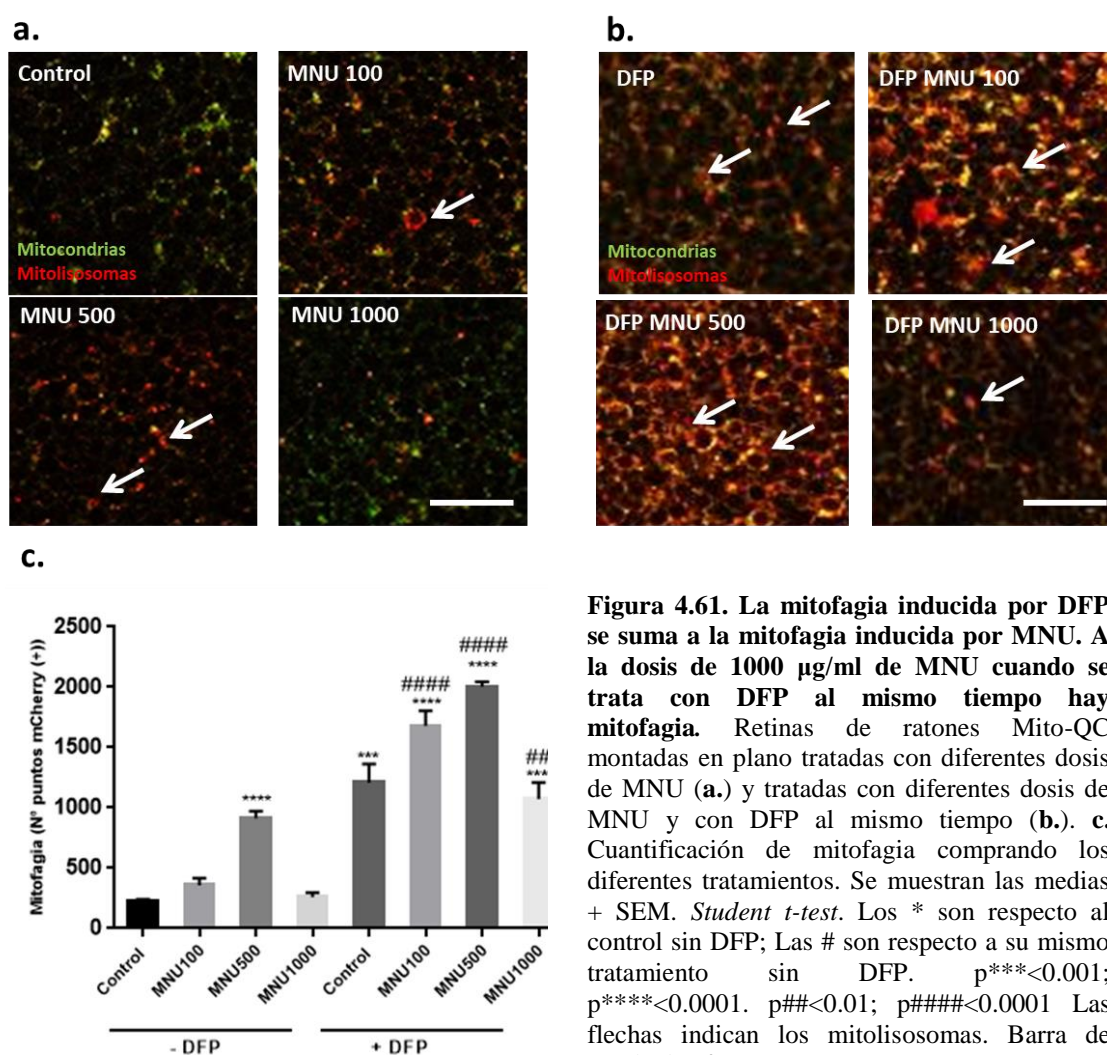


**Figura 4.60. La mitofagia inducida por DFP protege a las células ARPE-19 ante un daño con MNU.** Células ARPE-19 Mito-QC tratadas con diferentes dosis de MNU (a.) y tratadas con diferentes dosis de MNU y con DFP al mismo tiempo (b.). Barra de escala de 10 µm.

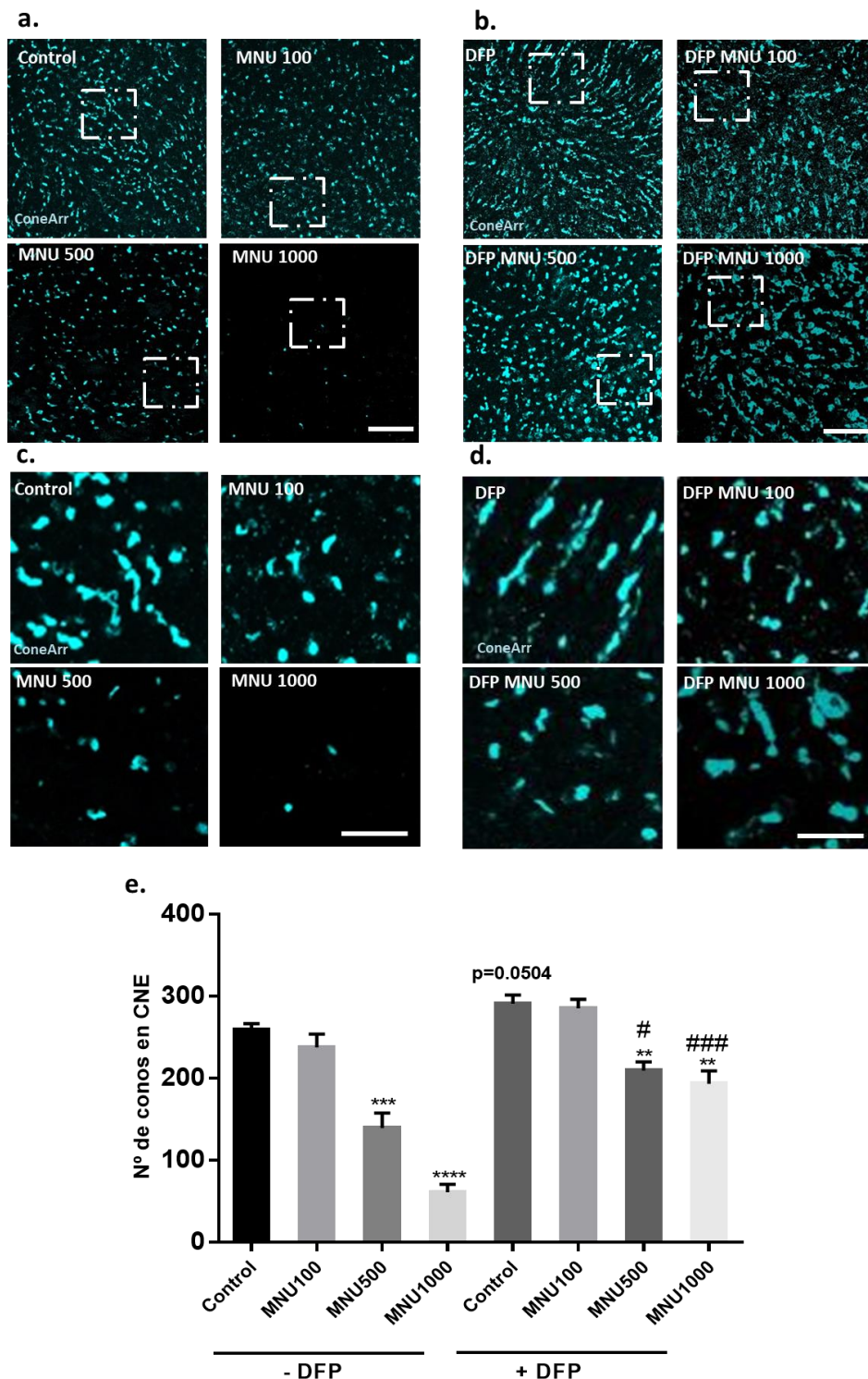
#### 4.1.6.2 La mitofagia tiene un papel neuroprotector en la degeneración de los conos

Por último, quisimos comprobar si la mitofagia desempeñaba un papel neuroprotector en los fotorreceptores de la retina, que es el objetivo principal de esta tesis. Para ello, se planteó el tratamiento *ex vivo* de retinas de ratones Mito-QC con las diferentes dosis de MNU estudiadas en combinación con DFP, inductor de mitofagia, que habíamos visto que era muy potente en el cultivo de retinas *ex vivo*. Para ello, llevamos a cabo un cultivo de retinas Mito-QC durante 18 horas, y estudiamos los niveles de mitofagia (**Figura 4.61**) y los niveles de conos mediante una inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-Arrestina de conos (**Figura 4.62**).

El MNU produce un aumento de mitofagia en las retinas de los ratones Mito-QC a la dosis de 100 µg/ml, que se incrementa más a la dosis de 500 µg/ml y vuelve a bajar a la dosis de 1000 µg/ml (**Figura 4.61 a**). Este fenómeno tenía lugar también en las células ARPE-19 (**Figura 4.54**). Cuando se tratan las retinas simultáneamente con MNU y DFP, vemos un pico de mitofagia tanto a la dosis de MNU de 100 µg/ml como a la dosis de 500 µg/ml, que disminuye a la dosis de 1000 µg/ml pero que está más aumentada que a dosis de MNU de 1000 µg/ml sin DFP (**Figura 4.61 b**).



Según la **figura 4.62**, observamos que con el MNU a la dosis de 100  $\mu\text{g/ml}$ , los conos ya están afectados, y que a dosis de 500  $\mu\text{g/ml}$  se reduce significativamente el número hasta casi desaparecer en la dosis de 1000  $\mu\text{g/ml}$  (**Figura 4.62 a.,c.**). Sin embargo, cuando las retinas son tratadas simultáneamente con MNU y DFP, tanto a la dosis de MNU de 500 como a la de 1000  $\mu\text{g/ml}$ , queda un número óptimo de conos (**Figura 4.62 b.,d.**). Por tanto, estos resultados nos indican que la mitofagia inducida por DFP retrasa la degeneración de los conos inducida por el MNU.



**Figura 4.62. La mitofagia inducida por el DFP rescata a los conos de la muerte que produce el MNU.** Retinas de ratones Mito-QC montadas en plano donde se muestra la inmunofluorescencia anti-Arrestina de Conos tratadas con diferentes dosis de MNU (a.) y tratadas con diferentes dosis de MNU y con DFP al mismo tiempo. Aumento de las imágenes dentro del recuadro del panel a. (c.) y dentro del recuadro del panel b. (d.) donde se muestran en más detalle los conos. **e.** Cuantificación del número de conos comparando los diferentes tratamientos. Se muestran las medias + SEM. *Student t-test*. Los \* son respecto al control sin DFP; Las # son respecto a su mismo tratamiento sin DFP.  $p^{***}<0.001$ ;  $p^{****}<0.0001$ .  $p^{\#}<0.05$ ;  $p^{###}<0.001$ . Barra de escala de 50µm.

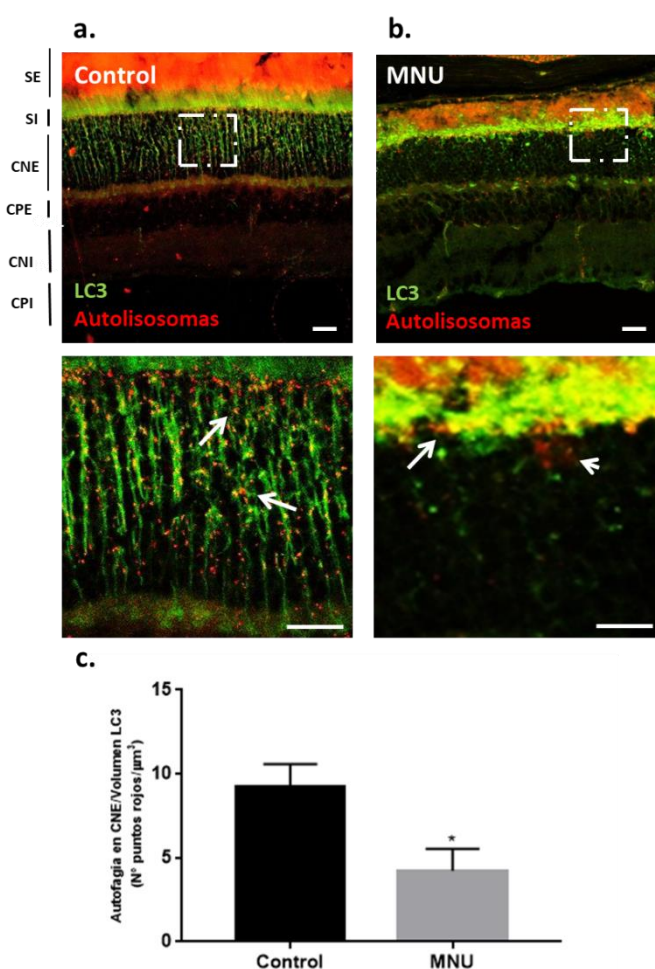


Para concluir, se han obtenido resultados satisfactorios, ya que un aumento de mitofagia protege de la neurodegeneración de los fotorreceptores causado por el MNU.

#### 4.1.7 Efectos del MNU en la macroautofagia de la capa nuclear externa

##### 4.1.7.1 El MNU modula de la misma manera la macroautofagia y la mitofagia: La macroautofagia que vemos en la CNE corresponde a mitofagia

Al igual que hemos estudiado la mitofagia, nos preguntábamos si el MNU afecta de la misma manera a la macroautofagia. Para ello, hemos realizado el mismo estudio en los ratones mCherry-GFP-LC3. En primer lugar, comparamos la macroautofagia entre secciones de ojos pertenecientes a ratones tratados con vehículo y ratones tratados con MNU durante un día (**Figura 4.63**). Observamos que al tratar los ratones con MNU durante 1 día, la macroautofagia en la CNE se ve disminuida y podemos observar autolisosomas en la parte inferior de los SI, los cuales, son de mayor tamaño que en las retinas control (**Figura 4.63**).

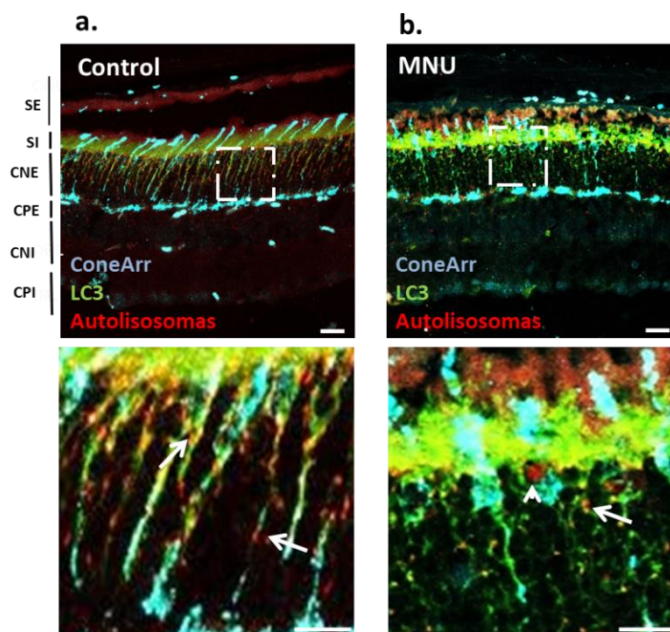




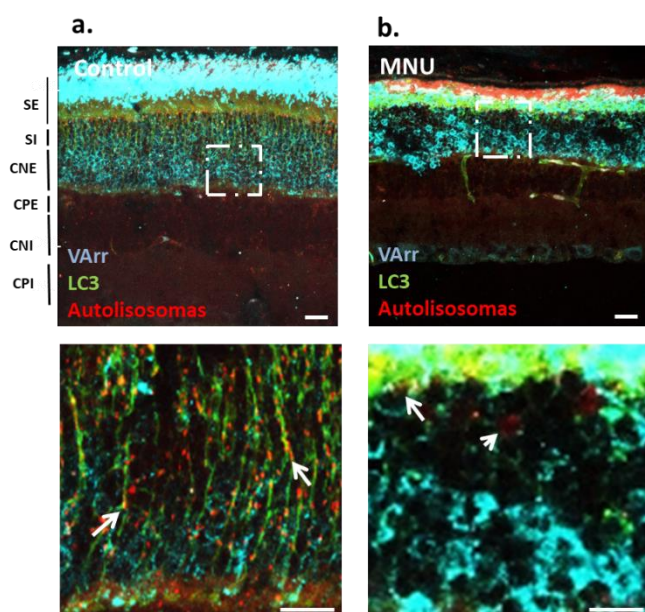
Estos resultados indican que el MNU afecta de igual manera a la macroautofagia que a la mitofagia.

También estudiamos si al igual que los mitolisosomas, los autolisosomas acumulados en la parte inferior de los SI también se encontraban en los conos, bastones y Glía de Müller (**Figuras 4.64- 4.66**). Algunos autolisosomas coinciden con los somas y con los pies de los conos (**Figura 4.64**), al igual que sucedía con los mitolisosomas.

**Figura 4.64.** Algunos de los autolisosomas acumulados con el tratamiento de MNU, se encuentran en los conos. **a.** Proyecciones máximas de secciones de retina de ratones mCherry-GFP-LC3 donde se muestra la inmunofluorescencia con Anti-Arrestina de Conos (cian) tratada con vehículo (**a.**) y tratada con MNU (**b.**) con aumento de las imágenes en recuadro en la parte inferior. Las flechas señalan la colocalización de autolisosomas con conos. Las puntas de flechas los autolisosomas de mayor tamaño. SE, segmentos externos; SI, segmentos internos; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI; capa plexiforme interna. Barra de escala de 50 y 10  $\mu\text{m}$ .



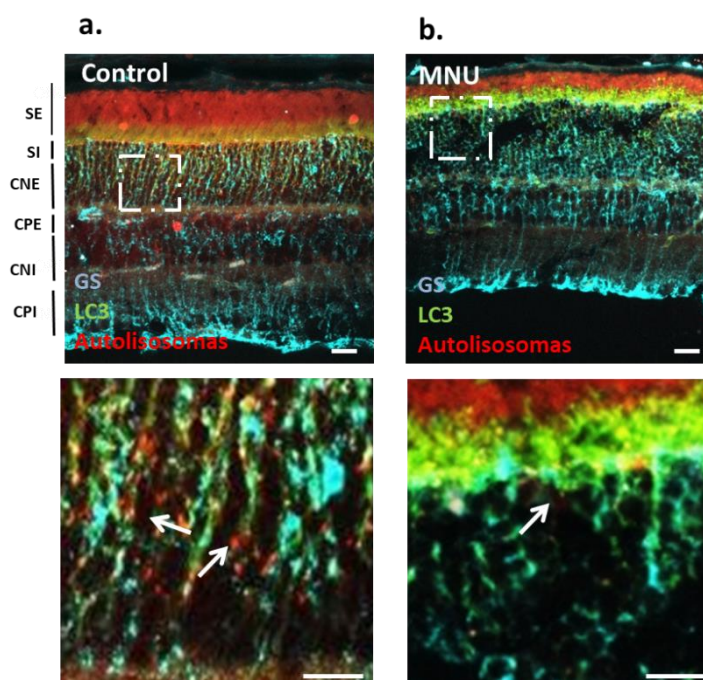
También, varios de estos autolisosomas los encontramos en los somas de los bastones (**Figura 4.65**).



**Figura 4.65.** Algunos de los autolisosomas acumulados con el tratamiento de MNU, se encuentran en los bastones. Proyecciones máximas de secciones de retina de ratones mCherry-GFP-LC3 donde se muestra la inmunofluorescencia con Anti-Arrestina visual (cian) tratada con vehículo (**a.**) y tratada con MNU (**b.**) con aumento de las imágenes en recuadro en la parte inferior. Las flechas señalan la colocalización de autolisosomas con bastones. Las puntas de flechas los autolisosomas de mayor tamaño. SE, segmentos externos; SI, segmentos internos; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI; capa plexiforme interna. Barra de escala de 50 y 10  $\mu\text{m}$ .

Para completar el estudio, en estas secciones, comprobamos si también esos autolisosomas se encuentran en la Glía de Müller como los mitolisosomas (**Figura 4.66**).

**Figura 4.66.** Algunos de los autolisosomas acumulados con el tratamiento de MNU, se encuentran en la Glía de Müller. Proyecciones máximas de secciones de retina de ratones mCherry-GFP-LC3 donde se muestra la inmunofluorescencia con Anti-Glutamina Sintetasa (cian) tratada con vehículo (**a.**) y tratada con MNU (**b.**) con aumento de las imágenes en recuadro en la parte inferior. Las flechas señalan la colocalización de autolisosomas con glía de Müller. SE, segmentos externos; SI, segmentos internos; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna. Barra de escala de 50 y 10  $\mu\text{m}$ .

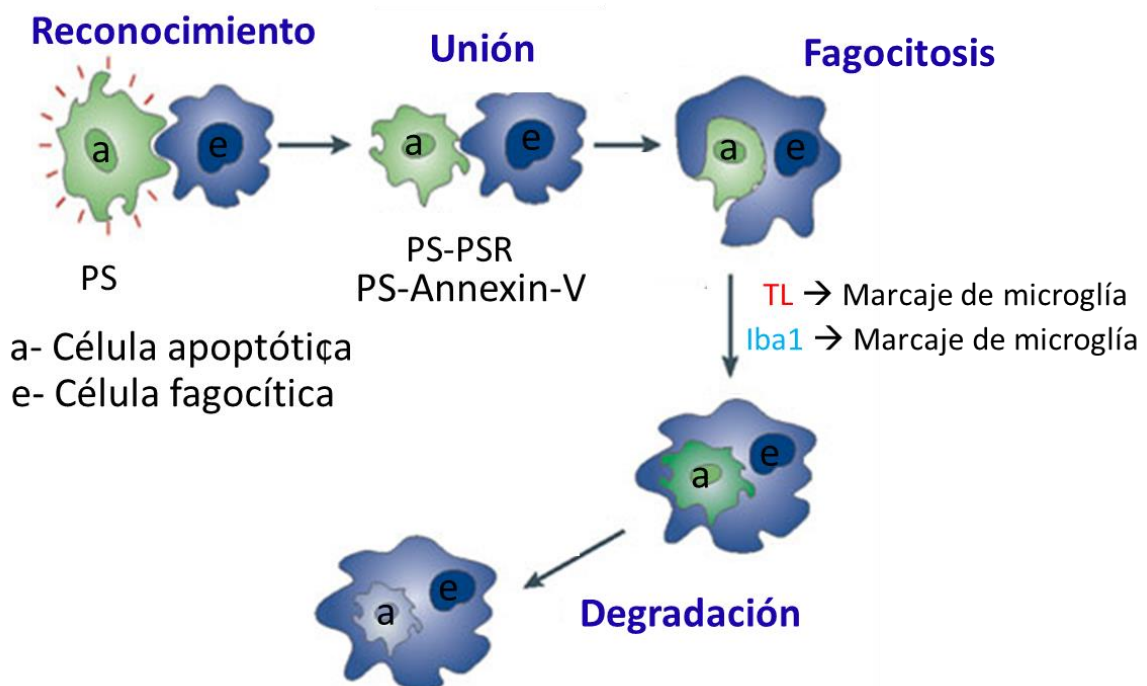


Concluimos, por tanto, que el MNU afecta de la misma forma a la macroautofagia que a la mitofagia, y que los autolisosomas y los mitolisosomas siguen el mismo patrón de localización. Por ello planteamos que la macroautofagia que tiene lugar en la CNE de la retina de ratones corresponde a mitofagia.

### 4.2 Papel de la autofagia en la muerte celular durante el desarrollo embrionario

La eliminación de las células apoptóticas por fagocitosis es un proceso fundamental durante el desarrollo de la retina. Si hay defectos de fagocitosis su acumulación provoca la liberación al espacio extracelular de los componentes celulares tras la rotura de la membrana plasmática y desencadena procesos proinflamatorios [165]. Independientemente de cómo y cuándo muera una célula, el mantenimiento de la función normal del órgano en el que ocurre esta muerte, requiere que las células muertas se eliminen antes de ser reemplazadas [241]. Las células fagocíticas, sean o no profesionales, son capaces de distinguir entre una célula viva o muerta [242].

Nos planteamos, por tanto, como proyecto en paralelo, estudiar el papel de la autofagia en la muerte celular que tiene lugar en la retina de ratón embrionaria durante su desarrollo, estudiando los diferentes pasos que tienen lugar desde el reconocimiento de la célula apoptótica por la célula fagocítica hasta su degradación, como se describe en la **figura 4.67**. Hemos utilizado dos modelos genéticos para estudiar este proceso, el ratón con deficiencia en la proteína implicada en autofagia Atg5 (Atg5  $-/-$ ) y el ratón deficiente en la fagocitosis asociada a LC3 (LAP  $-/-$ ), que tiene disminuido el proceso de eferocitosis, por el cual se lleva a cabo la eliminación de células apoptóticas por macrófagos. Estos estudios se han realizado a la edad embrionaria de 13 días y medio, que coincide con la muerte temprana de los neuroblastos recién diferenciados, en cultivo, durante 6 horas.



**Figura 4.67. Mecanismo de reconocimiento, fagocitosis y degradación de células apoptóticas.** El mecanismo de reconocimiento se lleva a cabo mediante la exposición de fosfatidilserina por la célula apoptótica. La célula fagocítica reconoce esta señal a través del receptor y se produce su fagocitosis. Más tarde se degrada.

#### 4.2.1 Estudio del proceso de fagocitosis en retinas de ratones deficientes de Atg5

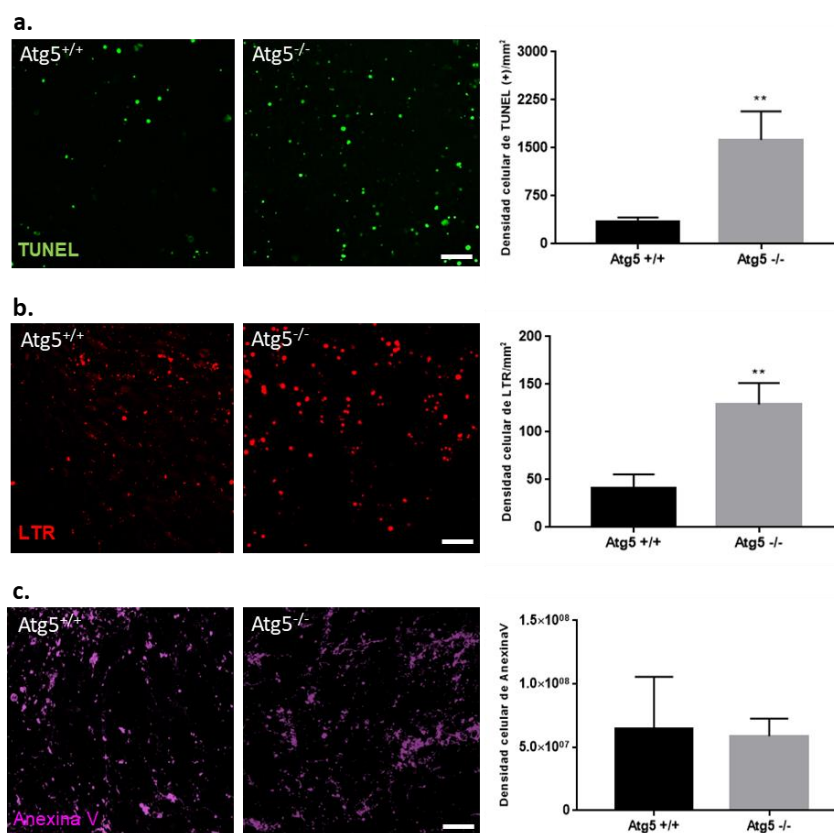
##### 4.2.1.1 Las retinas deficientes en Atg5 muestran un incremento de células TUNEL y LTR, pero mantienen los mismos niveles de exposición de fosfatidilserina

Resultados previos de nuestro laboratorio en la retina del pollo en estas etapas de desarrollo, muestran que la inhibición farmacológica de la autofagia produce un aumento del número de células positivas para la tinción de TUNEL en el neuroepitelio, y un número reducido de RGC. Este fenotipo está asociado con defectos de fagocitosis de los cuerpos apoptóticos como resultado de una reducción de los niveles de fosfatidilserina en la membrana de las células apoptóticas tras la inhibición de la autofagia y una disminución de ATP, ya que el ATP es necesario para la exposición de esta serina en la membrana [243]. En la presente tesis doctoral quisimos demostrar si la inhibición genética de la autofagia en ratones provocaba un fenotipo similar.

En primer lugar, determinamos la exposición de fosfatidilserina mediante el marcaje con AnexinaV, los niveles de muerte celular mediante la técnica de TUNEL, y la presencia

de compartimentos ácidos mediante el marcaje de LTR en retinas wt y deficientes de autofagia.

Observamos una acumulación de células TUNEL positivas y compartimentos ácidos (marcados con LTR) en la retina deficiente en autofagia (**Figura 4.68**) mientras que los niveles de exposición de fosfatidilserina en las retinas deficientes en Atg5 fueron similares a los niveles en la retina wt. Esto sugiere que la deficiencia de Atg5 provoca una acumulación de células apoptóticas en las retinas, pero no hay alteraciones en la exposición de PS.



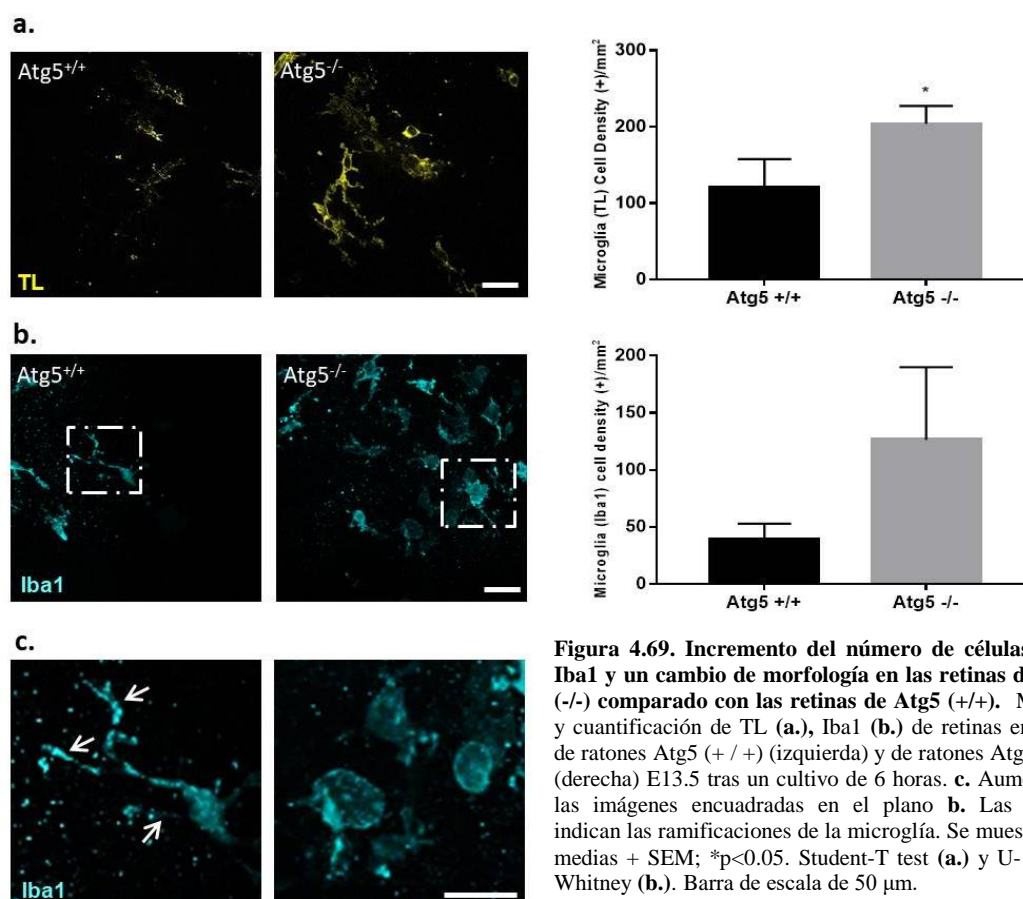
**Figura 4.68. Incremento de TUNEL y LTR en las retinas de Atg5<sup>-/-</sup>, iguales niveles de Annexin V.** Marcaje y cuantificación de TUNEL (a.), LTR (b.) y Annexin V (c.) de retinas en plano de ratones Atg5<sup>+/+</sup> (izquierda) y de ratones Atg5<sup>-/-</sup> (derecha) E13.5 tras un cultivo de 6 horas. Los datos se muestran como media + SEM; \*\*p<0.01, U- Mann-Whitney. Barra de escala de 50  $\mu$ m.

### 4.2.1.2 Las retinas deficientes en Atg5 muestran más fagocitosis que las retinas WT

En estas etapas de desarrollo de la retina del ratón, la microglía se encarga de la eferocitosis (fagocitosis y degradación) de las células apoptóticas. Observamos un aumento en el número de células microgliales, teñidas con TL e Iba 1, en la retina deficiente en Atg5



en comparación con las retinas wt (**Figura 4.69 a-b**). Curiosamente, estas células mostraron un fenotipo más ameboide en las retinas deficientes en autofagia, lo que sugiere su activación (**Figura 4.69 c**).



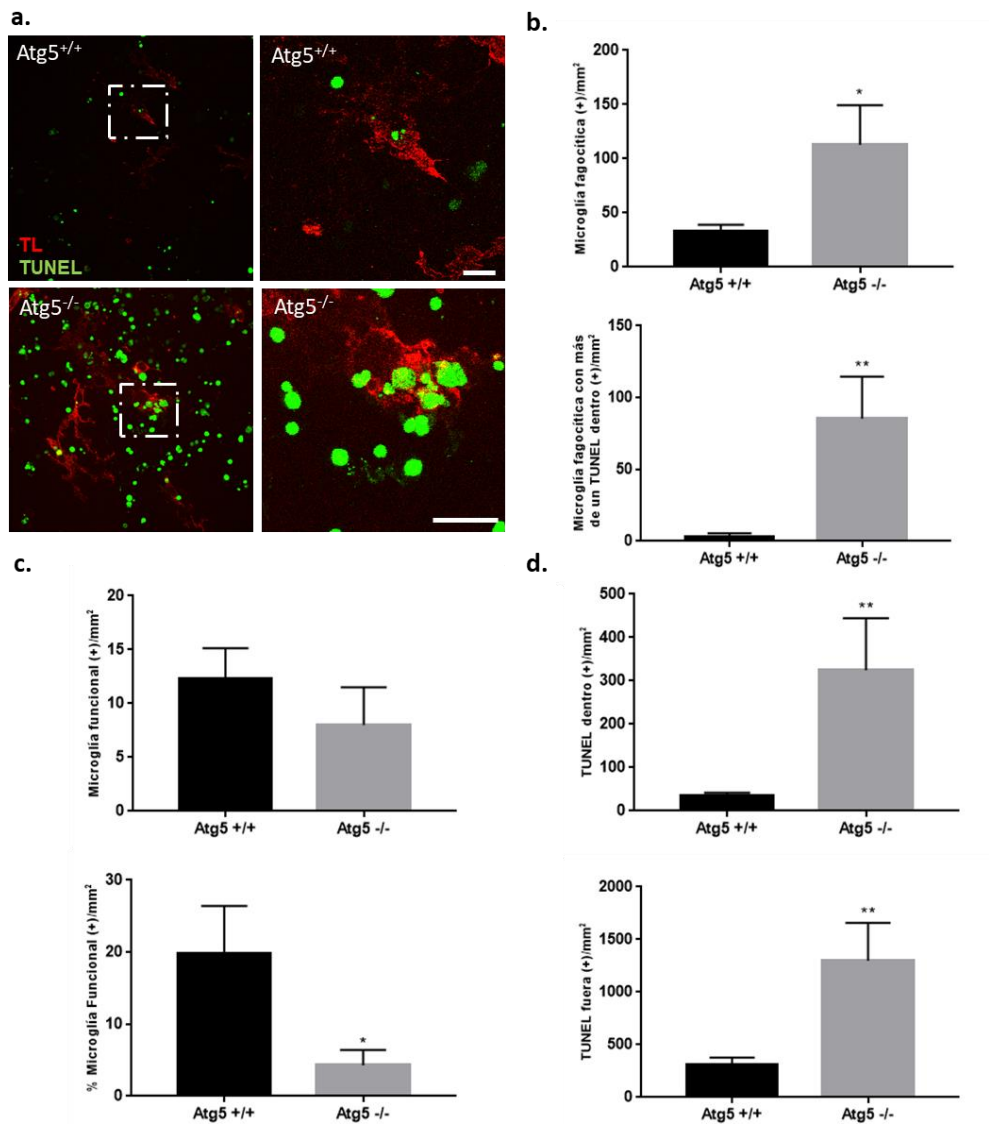
Además, nuestros datos muestran una mayor densidad de microglía fagocítica, definida como células microgliales con al menos una célula TUNEL-positiva en su interior (**Figura 4.70 a-b**). Curiosamente, cada célula microglial en la retina deficiente en Atg5 mostró varios cadáveres positivos para TUNEL en comparación con uno o dos por célula microglial en las retinas wt (**Figura 4.70 a-b**). Esto nos lleva a la pregunta si esta microglía era funcional, es decir, si había tantas células apoptóticas que degradar que veíamos esa acumulación en la microglía porque la degradación no se podía llevar a cabo más rápido, o bien, si es porque había un déficit en la degradación de los cuerpos apoptóticos.

Cuando observamos la microglía funcional (Microglía fagocítica/TUNEL) no observamos grandes cambios entre las retinas Atg5<sup>+/+</sup> y las retinas Atg5<sup>-/-</sup>, sin embargo, con respecto a la microglía total presente en las retinas, los resultados mostraron que el % de microglía funcional es menor en las retinas deficientes en Atg5 (**Figura 4.70 a,c**). Estos



datos indican que, aunque haya más fagocitosis en las retinas deficientes en Atg5, la microglía de Atg5 presenta alteraciones a nivel de degradación.

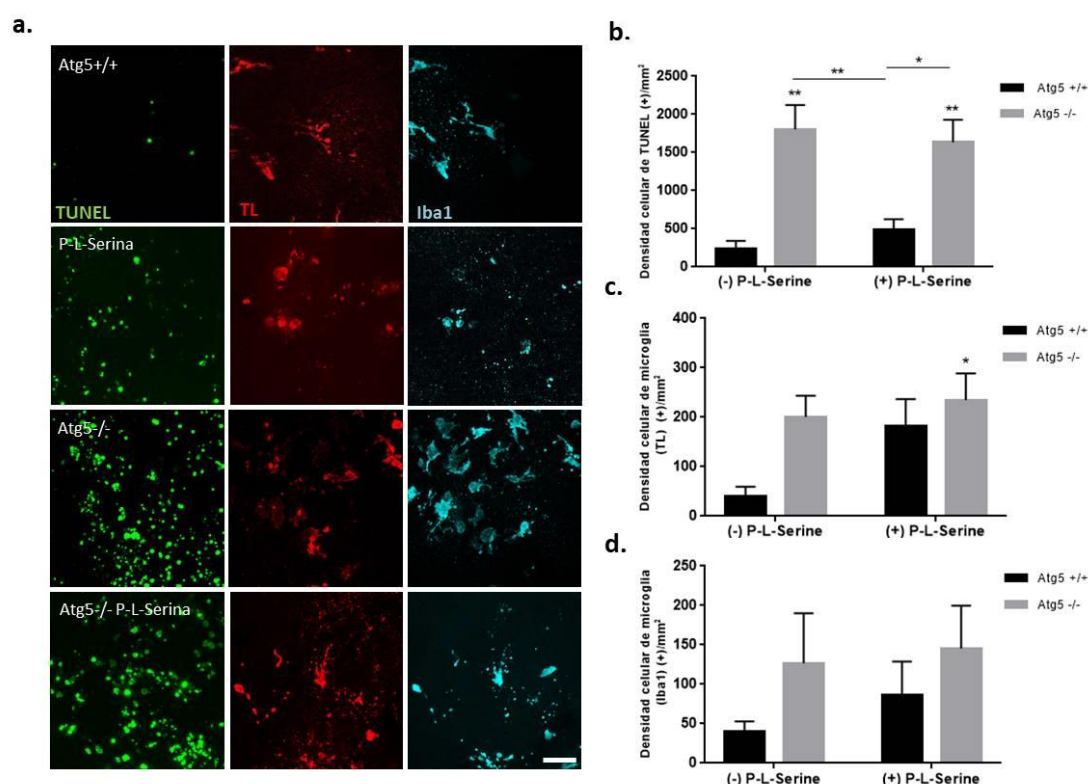
Por otro lado, observamos que tanto el número de TUNEL fuera de las células microgliales como el de TUNEL dentro de las mismas, es mayor en las retinas Atg5  $-/-$  (**Figura 4.70 a.,d.**) lo que sugiere que no se está llevando a término la eliminación de las células apoptóticas.



**Figura 4.70. Acumulación de células TUNEL positivas dentro de las células microgliales en las retinas de ratones Atg5  $-/-$ .** a) Tinción de TUNEL y de TL en retinas montadas en plano de ratones Atg5  $+/+$  y Atg5  $-/-$  E13.5 tras un cultivo de 6 horas, en la parte inferior se muestra el aumento de las imágenes en recuadro de las imágenes superiores. b) Cuantificación de microglía fagocítica (TUNEL con TL) (arriba) y microglía fagocítica con más de un TUNEL en el interior (abajo). c) Cuantificación de la microglía fagocítica funcional (TUNEL con TL entre el total de TUNEL) (arriba) y % de microglía funcional (Microglía funcional entre el total de la microglía) (abajo). d) Cuantificación de TUNEL dentro (arriba) y fuera (abajo). Se muestran las medias + SEM; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . Student-T test a las cuantificaciones de microglía fagocítica, microglía funcional y TUNEL dentro y U- Mann-Whitney al resto de mediciones. Barra de escala de 50  $\mu$ m.

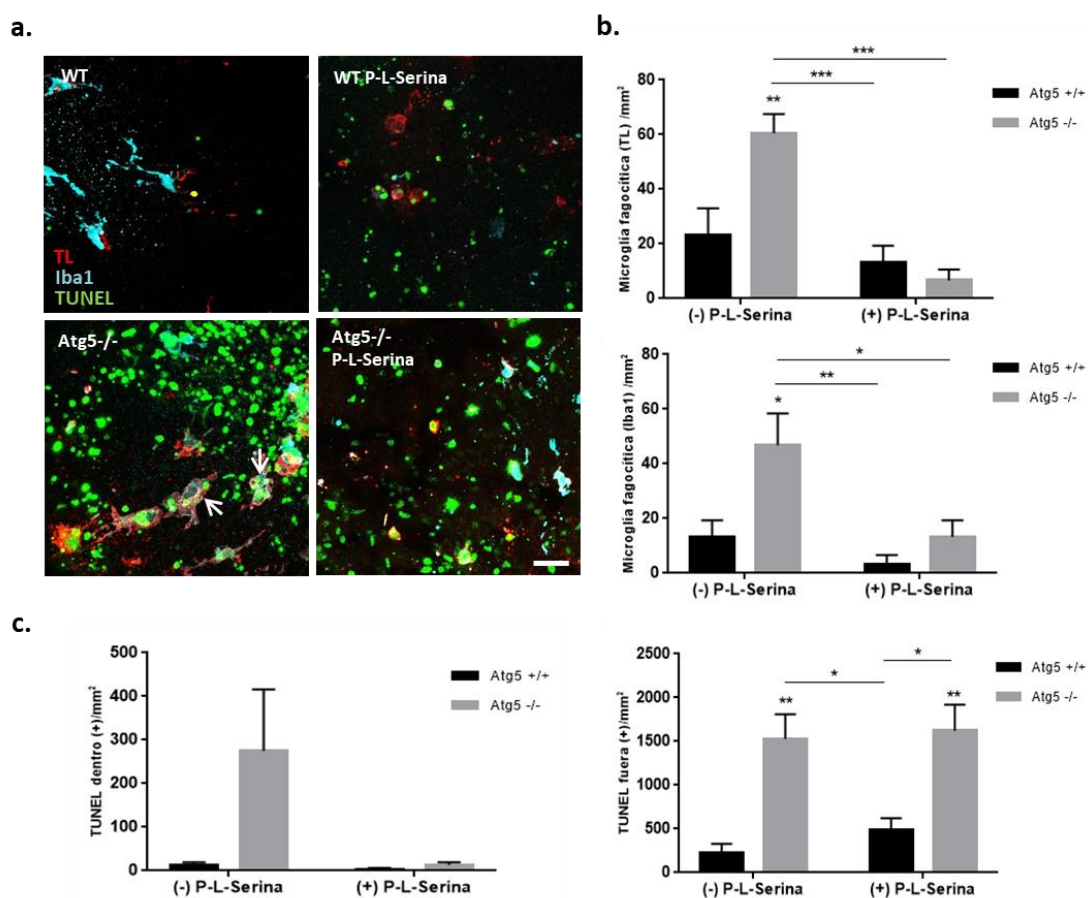
### 4.2.1.3 Las retinas deficientes en *Atg5* presentan un bloqueo de degradación de los cuerpos apoptóticos

Para determinar si la acumulación de células apoptóticas en las retinas deficientes en autofagia se debe realmente a un problema de degradación, bloqueamos el reconocimiento por parte del receptor de fosfatidilserina con *phospho-L-serina* (P-L-Ser) que se une al receptor y bloquea la fagocitosis de las células muertas. Observamos un aumento de células TUNEL positivas en retinas wt al tratarlas con P-L-Ser, mientras que no se observó un aumento mayor en las retinas deficientes de *Atg5* (**Figura 4.71 a-b.**). Estos datos sugieren que el bloqueo en las retinas deficientes en *Atg5* no se encuentra a nivel de fagocitosis, sino a nivel de degradación, ya que todas las células que están siendo fagocitadas no están siendo degradadas. Además, la P-L-Ser indujo un aumento en el número de células microgliales que fue similar a los niveles encontrados en las retinas *Atg5*, lo que sugiere que tanto los defectos de fagocitosis como los de degradación dan como resultado un incremento de las células microgliales (**Figura 4.71 a,c,d.**).



**Figura 4.71. Niveles similares de TUNEL y microglía entre *Atg5* -/- y *Atg5* +/+ con P-L-Serina. a.** Tinción e inmunofluorescencia de TUNEL, TL e Iba1 en retinas en plano *Atg5* (+/+) y *Atg5* (-/-) con y sin P-L-Serina E13.5 tras un cultivo de 6 horas. Cuantificación de la densidad de células TUNEL (**b.**), de la densidad de células TL (**c.**) y de la densidad de células Iba1 comparando genotipos y tratamientos. Se muestran las medias + SEM; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . Two-way ANOVA. Barra de escala de 50  $\mu\text{m}$ .

En cuanto a la microglía fagocítica, se observa una disminución en las retinas tratadas con P-L-Ser como era de esperar al inhibir el reconocimiento de fosfatidilserina (**Figura 4.72 a-b**). El número de TUNEL acumulado dentro de la microglía disminuye también al tratar con P-L-Ser, mientras que el TUNEL de fuera, no encontramos cambios con P-L-Ser, aunque esperaríamos un ligero aumento ya que el TUNEL que se acumula dentro en las retinas deficientes en Atg5 debería quedarse fuera al inhibir el receptor (**Figura 4.72 a,c**).

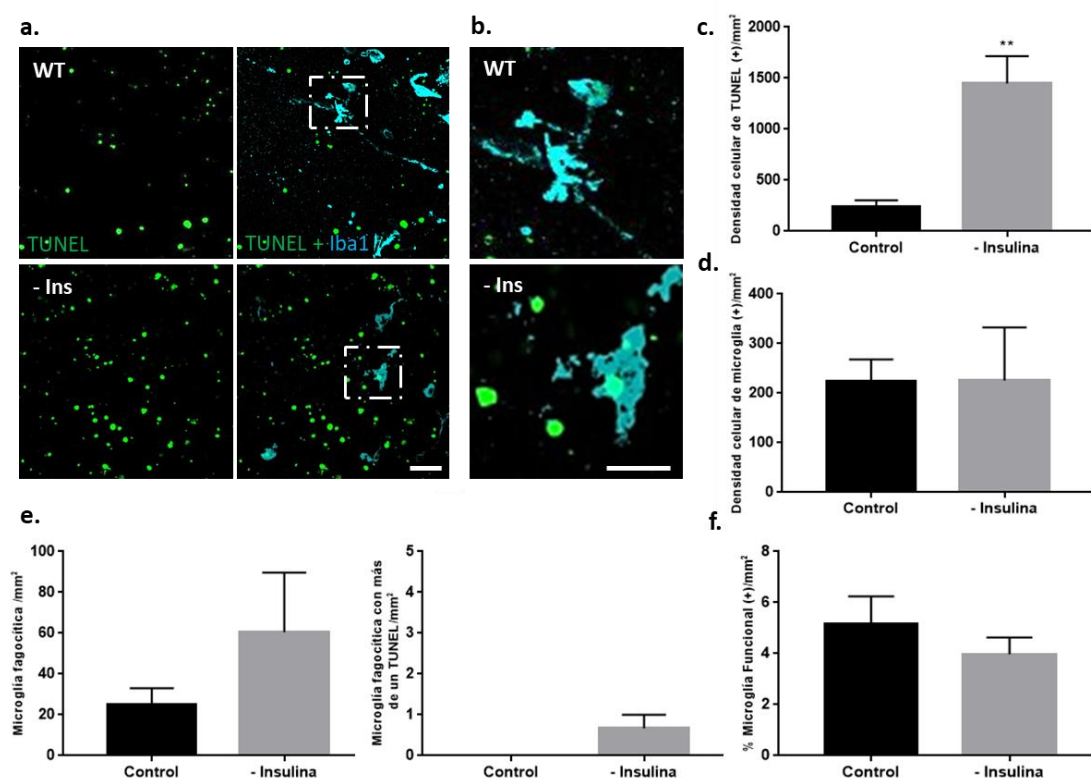


**Figura 4.72.** Los niveles de TUNEL similares observados entre las retinas Atg5 -/- y las tratadas con P-L-serina se encuentran fuera de las células microgliales, ya que se inhibe el reconocimiento con P-L-serina. **a.** Tinción de TUNEL, TL e Iba1 en retinas montadas en plano de ratones Atg5 (+/+) y Atg5 (-/-) con y sin P-L-serina E13.5 tras un cultivo de 6 horas. **b.** Cuantificación de la microglía fagocítica TL e Iba1. **c.** Cuantificación de TUNEL en el interior y en el exterior de las células microgliales. Se muestran las medias + SEM; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. Two-way ANOVA. Barra de escala de 50 µm.

### 4.2.1.4 Las células microgliales de las retinas deficientes en Atg5 presentan alteraciones en la degradación de las células apoptóticas

En base a los resultados anteriores, nos preguntamos si cuando hay un gran aumento de muerte celular, la microglía no puede llevar a cabo una degradación óptima, o por el

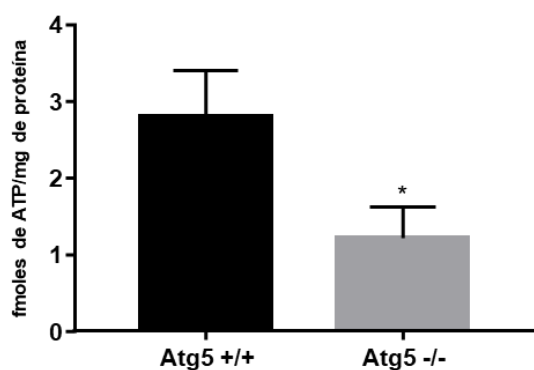
contrario, si Atg5 es necesario para que se complete el proceso de degradación de las células apoptóticas. Para llevar a cabo este estudio, lo que hicimos fue cultivar retinas wt sin insulina, para inducir muerte celular, ya que es un factor de supervivencia durante el desarrollo de la retina embrionaria [244] y estudiar así la degradación de las células apoptóticas en estas retinas. Se observa que en las retinas WT cultivadas sin insulina, hay un aumento de células apoptóticas (**Figura 4.73 a.,c.**), mientras que la microglía se mantiene en los mismos niveles (**Figura 4.73 a.,d.**). No se observan cambios en la microglía fagocítica ni en la microglía funcional (**Figura 4.73 e.-f.**), ni acumulaciones de células TUNEL positivas en el interior de las células microgliales (**Figura 4.73 b.**), lo que quiere decir que la microglia a estas edades es capaz de fagocitar y degradar gran cantidad de células apoptóticas. Estos resultados apoyarían la hipótesis de que Atg5 es necesario para que se lleve a cabo la degradación de las células apoptóticas, indicando un déficit en la microglia de las retinas Atg5<sup>-/-</sup>.



**Figura 4.73.** En las retinas WT en las que eliminamos la insulina del cultivo, no se observa acumulación de células TUNEL positivas dentro de la microglía. **a.** Tinción de TUNEL e inmunofluorescencia de Iba1 en retinas WT montadas en plano E13.5 cultivadas en medio sin insulina durante 6 horas. **b.** Aumento de las imágenes en el recuadro del panel (a.). **c.** Cuantificación de la densidad celular de TUNEL. **d.** Cuantificación de la densidad celular de microglía. **e.** Cuantificación de microglía fagocítica y microglía fagocítica con más de un TUNEL dentro. **f.** Cuantificación del % de microglía fagocítica. Se muestran las medias + SEM; \*\* $p < 0.01$ . Student-T test en las cuantificaciones **c.**, **d.** y **f.** y U-Mann-Whitney al resto de mediciones. Barra de escala de 50  $\mu$ m.

### 4.2.1.5 Las retinas deficientes en *Atg5* presentan menores niveles de ATP y alteración en los compartimentos ácidos.

Los nutrientes obtenidos por la autofagia tienen un importante papel en la producción de ATP [245], ya que la degradación lisosomal genera componentes celulares como aminoácidos, ácidos grasos libres y carbohidratos que pueden ser reciclados para mantener las funciones energéticas y biosintéticas de la célula [246], [247]. En resultados previos del laboratorio, cuando se inhibía la autofagia con 3MA, se producía un bloqueo de la exposición de PS debido a un déficit de ATP. Esta exposición de PS se recuperaba cuando las retinas se trataban con metil piruvato, un análogo permeable del piruvato que es capaz de entrar en el ciclo de Krebs para generar ATP, ya que se restauraban los niveles de ATP [243]. En función de esto, nos planteamos medir el ATP de las retinas deficientes en *Atg5*, ya que como habíamos visto un bloqueo en la degradación, nos preguntamos si habría por tanto menores niveles de ATP. Lo que observamos, es que las retinas de los ratones *Atg5*<sup>-/-</sup> presentaban menos ATP que las retinas WT (**Figura 4.74**). Sin embargo, en las retinas deficientes de *Atg5* hemos visto que no hay un bloqueo de exposición de PS aunque haya menos ATP, por lo que el modelo que vemos en ratón y el modelo que vemos en pollo son diferentes.

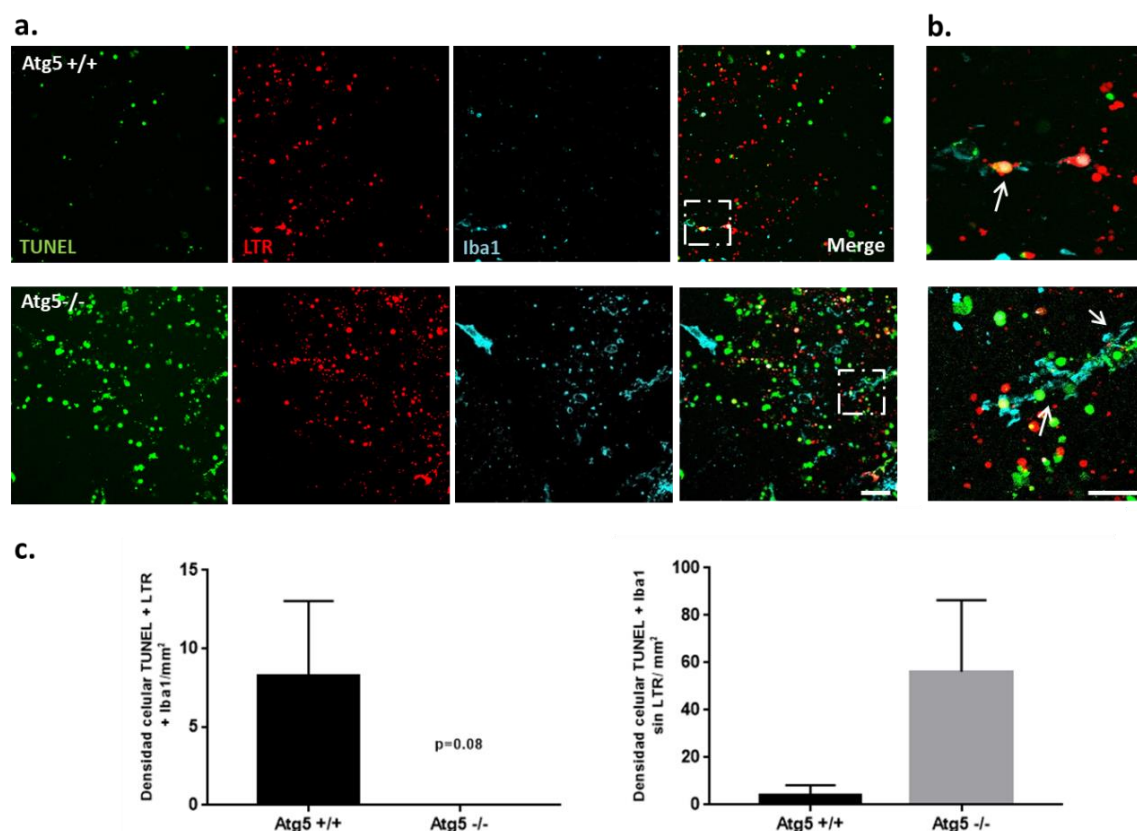


**Figura 4.74.** Las retinas de los ratones *Atg5*<sup>-/-</sup> presentan menores niveles de ATP comparado con las retinas *Atg5*<sup>+/+</sup>. Determinación de los niveles de ATP en retinas de ratones *Atg5*<sup>+/+</sup> y *Atg5*<sup>-/-</sup>. \* $p < 0.05$ . Se muestran las medias + SEM. Student *t*-test.

Uno de los orgánulos fundamentales para que se complete la degradación de los cuerpos apoptóticos son los lisosomas [2]. Los cuales llevan a cabo el proceso de degradación mediante las proteasas presentes en su lumen. Para el buen funcionamiento de estas es necesario un pH ácido como se ha descrito en la introducción. Sin embargo, como se muestra en la **figura 4.68**, hay mayor cantidad de puntos de LTR en las retinas deficientes de *Atg5*. Por ello, miramos si estos lisosomas marcados con LTR coinciden con



la microglía en los ratones deficientes de Atg5, colocación necesaria para que se lleve a cabo la degradación. Lo que observamos fue una disminución del tripe marcaje Iba1, TUNEL y LTR en las retinas deficientes de Atg5, vemos TUNEL dentro de Iba1, pero estos no coinciden con lisosomas funcionales (**Figura 4.75**). Estos datos parecen sugerir que quizás hay una menor fusión del fagosoma con el lisosoma en las retinas deficientes de Atg5KO.



**Figura 4.75.** En las retinas Atg5<sup>-/-</sup> se observa una disminución de la colocación TUNEL + LTR (+) dentro de las células fagocíticas (Iba1 +) **a.** Tinción de TUNEL y LTR e inmunofluorescencia de Iba1 en retinas WT y Atg5<sup>-/-</sup> E13.5 montadas en plano tras un cultivo de 6 horas. **b.** Aumento de las imágenes en el recuadro del panel (**a.**). **c.** Cuantificación de la densidad celular de células con triple marcaje: TUNEL, LTR e Iba1 (izquierda) y cuantificación de la densidad celular de microglía con TUNEL dentro no coincidente con LTR (derecha). Se muestran las medias + SEM. *Student t-test*. Barra de escala de 50  $\mu$ m.

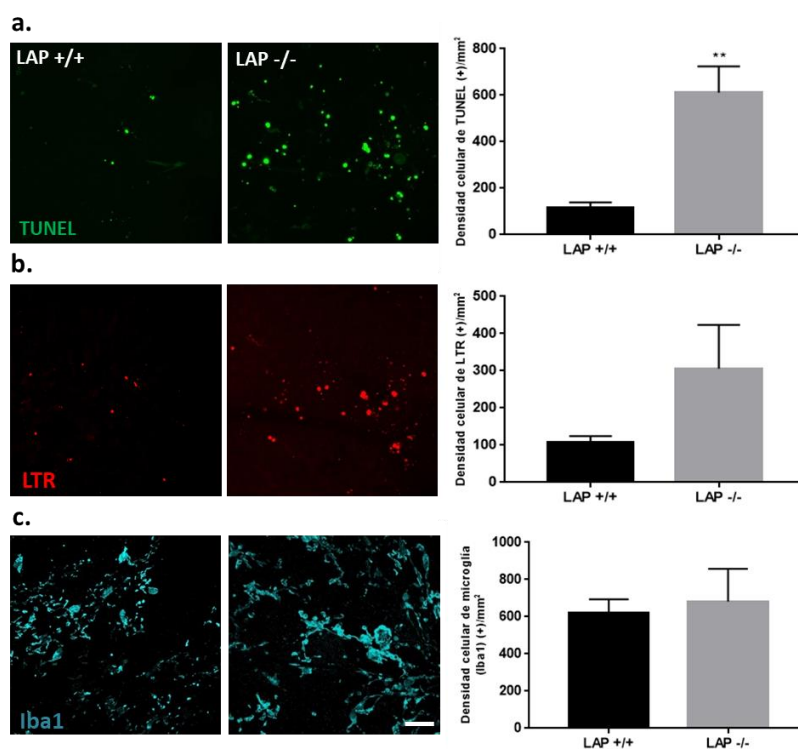
Hasta el momento, los resultados presentados en este apartado indican que las retinas deficientes en Atg5 presentan un bloqueo en la degradación de los cuerpos apoptóticos, acumulándose estos en el interior de las células microgliales y que esto podría ser debido a alteraciones en la fusión fagosoma-lisosoma.



### 4.2.2 Estudio del proceso de fagocitosis en retinas de ratones LAP $-/-$

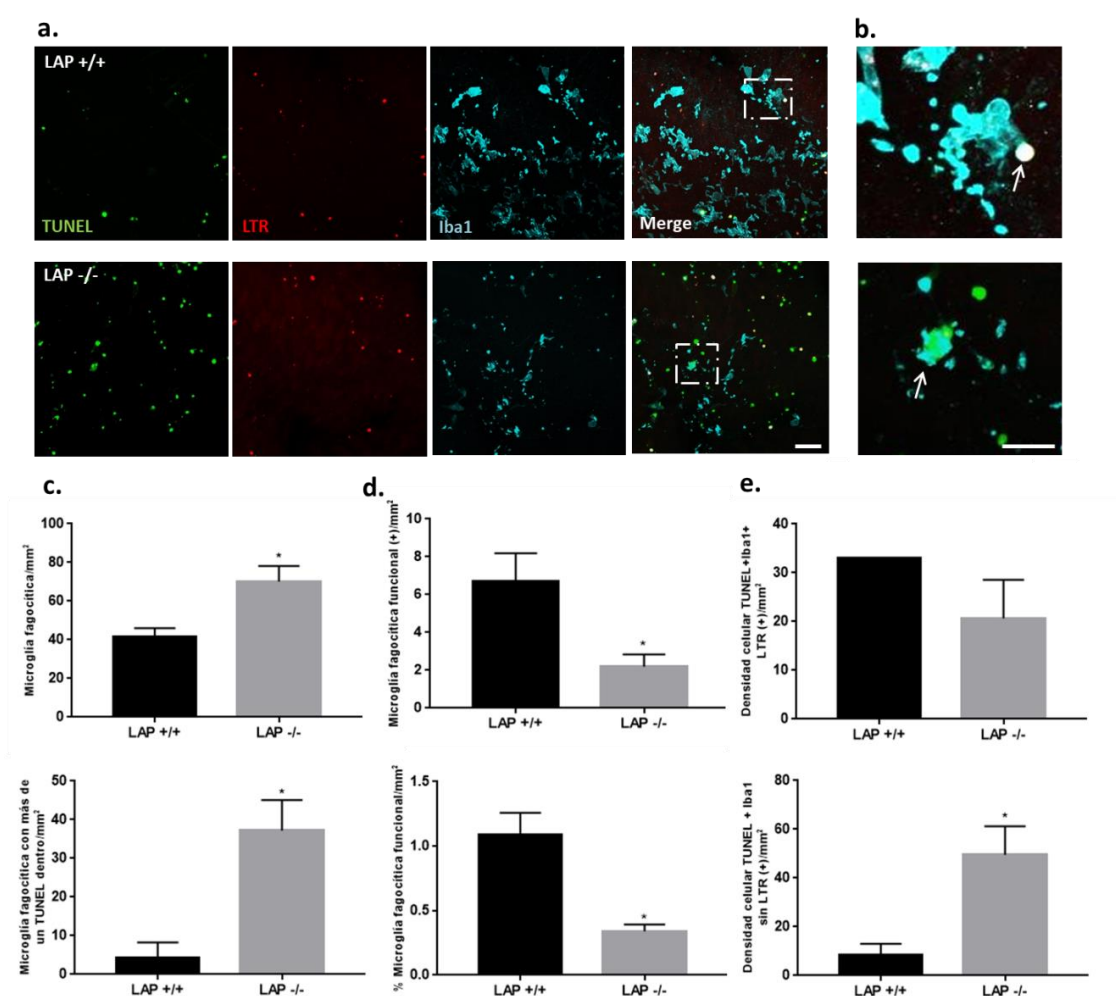
#### 4.2.2.1 La fagocitosis asociada a LC3 (LAP) es esencial para la degradación de las células apoptóticas durante el desarrollo de la retina murina

Atg5, aparte de estar implicado en la vía de autofagia canónica, está implicado en la autofagia no canónica, como la fagocitosis asociada a LC3 (LAP), donde LC3 se lipida en fagosomas con membrana sencilla tras engullir patógenos bacterianos y fúngicos o células necróticas y apoptóticas [126], [129], [130]. Atg5 forma parte de un complejo de ubiquitina que permite llevar a cabo la lipidación de LC3 en la membrana de los fagosomas, el complejo ATG12–ATG5–ATG16L1 [138]. Para estudiar esta vía, disponemos de los ratones LAP  $-/-$  que son deficientes para Atg16L1 y por lo tanto no pueden llevar a cabo esta autofagia no canónica. Las retinas deficientes en LAP mostraron niveles aumentados de TUNEL (**Figura 4.76 a**) y LTR (**Figura 4.76 b**). Curiosamente, los niveles de microglía en las retinas deficientes en LAP no incrementaron en comparación con los de las retinas wt.



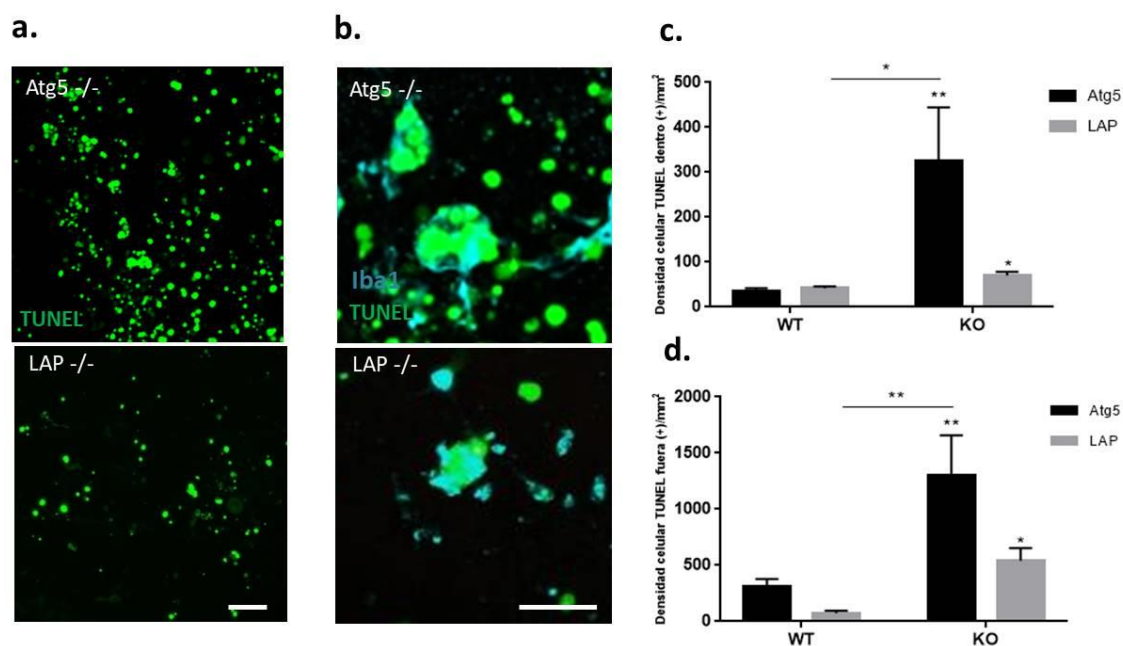
**Figura 4.76.** Hay un incremento en el marcaje de TUNEL y una tendencia en LTR en las retinas de LAP  $-/-$  comparado con las retinas de LAP  $+/+$ . Los niveles de Iba1 permanecen constantes entre un genotipo y otro. Marcaje y cuantificación de TUNEL (a.), LTR (b.) e inmunofluorescencia y cuantificación de Iba1 (c.) de retinas en plano de ratones LAP  $+/+$  y de ratones LAP  $-/-$  E13.5 tras un cultivo de 6 horas. Se muestran las barras SEM; \*\*p < 0.01. Student t-test en las cuantificaciones a. y b., en la cuantificación c., U- Mann-Whitney. Barra de escala de 50  $\mu$ m.

En los ratones deficientes de LAP, también se observa un aumento de la microglía fagocítica y una acumulación de células TUNEL positivas en el interior de las células microgliales (Figura 4.77 a-c). La microglía funcional, también es menor respecto a los ratones wt (Figura 4.77 d.) y la mayoría de las células microgliales que tienen en su interior TUNEL no tienen LTR (Figura 4.77 b.,e.). Todos estos resultados son similares a lo que ocurre en las retinas deficientes en Atg5.



**Figura 4.77.** En las retinas deficientes en LAP, hay una acumulación de los cuerpos apoptóticos en las células microgliales, los cuales, no coinciden con LTR. **a.** Tinción de TUNEL y LTR e inmunofluorescencia de Iba1 en retinas LAP (+ / +) y de ratones LAP (- / -) E13.5 montadas en plano tras un cultivo de 6 horas. **b.** Aumento de las imágenes en el recuadro del panel (a.). **c.** Cuantificación de la microglía fagocítica con un TUNEL (arriba) o más de un TUNEL (abajo) dentro. **d.** Cuantificación de la microglía fagocítica funcional (arriba) y con respecto a la microglía total (abajo). Cuantificación de la densidad celular de células con triple marcaje: TUNEL, LTR e Iba1 (arriba) y cuantificación de la densidad celular de microglía con TUNEL dentro no coincidente con LTR (abajo). Se muestran las medias + SEM. Student t-test en la cuantificación de densidad de células con triple marcaje, para el resto de parámetros U-Mann-Whitney. Barra de escala de 50 µm.

Posteriormente comparamos la cantidad de TUNEL tanto dentro como fuera de la microglía en las retinas de los ratones deficientes en LAP y deficientes en Atg5. Encontramos que con respecto a las retinas wt, ambos genotipos deficientes presentan un incremento en el TUNEL tanto fuera como dentro de la microglía (**Figura 1.78**), sin embargo, el aumento en las retinas deficientes de LAP es menor que en las deficientes en Atg5.



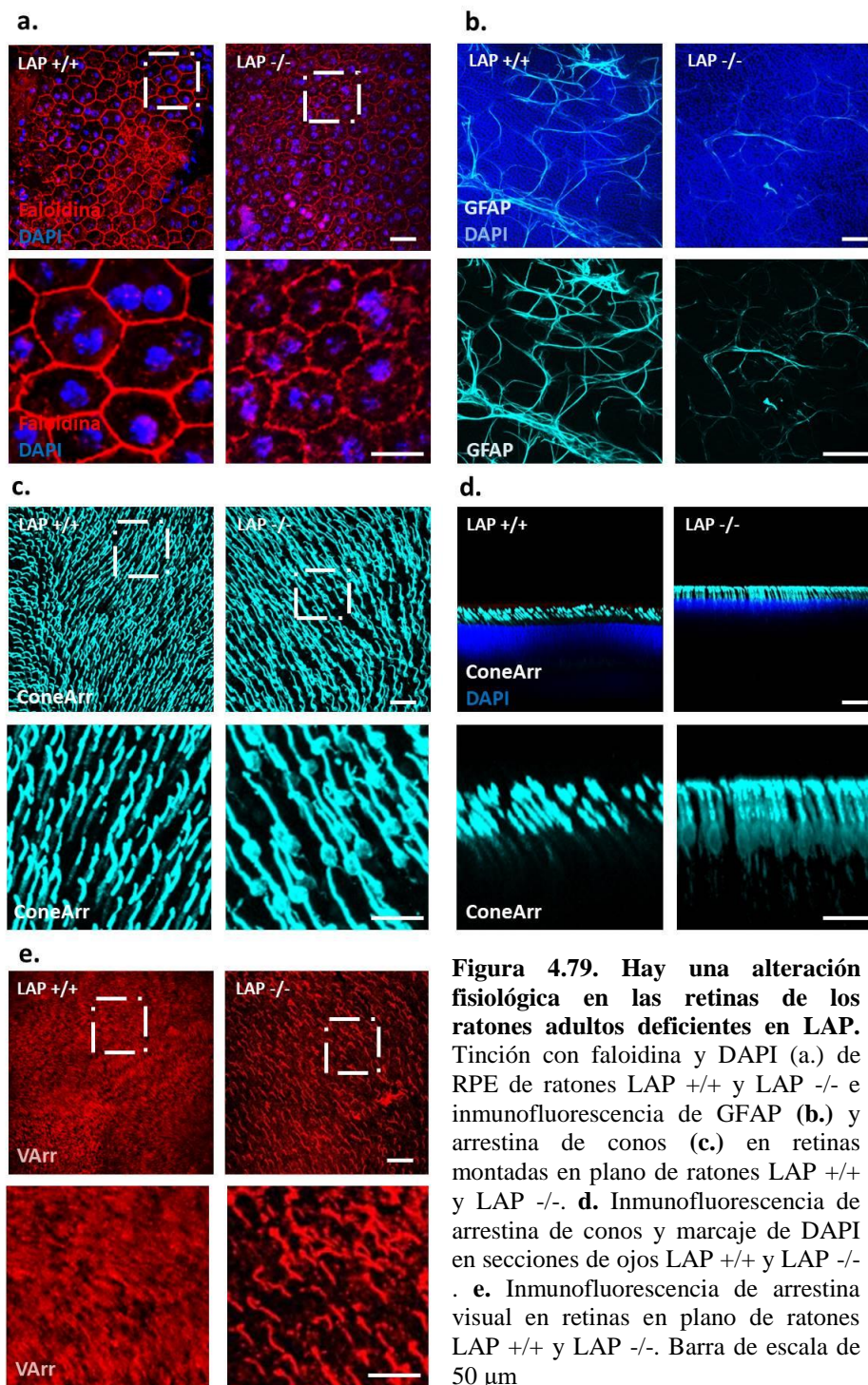
**Figura 1.78.** Los niveles de TUNEL tanto dentro como fuera de la microglía en las retinas deficientes en LAP son mayores que en las retinas WT, pero no llegan a los niveles de las retinas deficientes en Atg5. **a.** Tinción de TUNEL e inmunofluorescencia de Iba1 en retinas LAP (+ / +) y de ratones LAP (- / -) E13.5 montadas en plano tras un cultivo de 6 horas. **b.** Imágenes con zoom de 2 mostrando la acumulación de las células TUNEL dentro de la microglía. **c.** Cuantificación del número de TUNEL dentro de la microglía. **d.** Cuantificación del número de TUNEL fuera de la microglía. Se muestran las medias + SEM. \*p<0.05; \*\*p<0.01. El asterisco es respecto a cada control. Two-way ANOVA. Barra de escala de 50  $\mu$ m y de 10  $\mu$ m.

Estos resultados nos sugieren que la fagocitosis asociada a LC3 es esencial para la degradación de las células apoptóticas durante el desarrollo.

### 4.2.2.2 LAP tiene un papel imprescindible en la retina y RPE de ratones adultos

A diferencia de los animales deficientes de Atg5 que son letales al nacer, los animales LAP son viables. Por lo miramos la implicación de LAP en las retinas y RPE de ratones adultos. Para ello montamos en plano retinas y RPE e hicimos cortes de ojo. Observamos una alteración de las paredes celulares (marcaje con faloidina) de las células de RPE deficientes en LAP en comparación con las células del RPE WT (**Figura 1.79**). En la retina observamos una disminución de la tinción de GFAP y una internalización del

marcaje de arrestina de conos así como de arrestina visual (**Figura 1.79**). Todos estos parámetros nos indican una alteración fisiológica en la retina y del epitelio pigmentario de los animales adultos y deficientes para LAP. Estos resultados indican la importante implicación de LAP en la retina, tanto durante el desarrollo embrionario como en edad adulta.

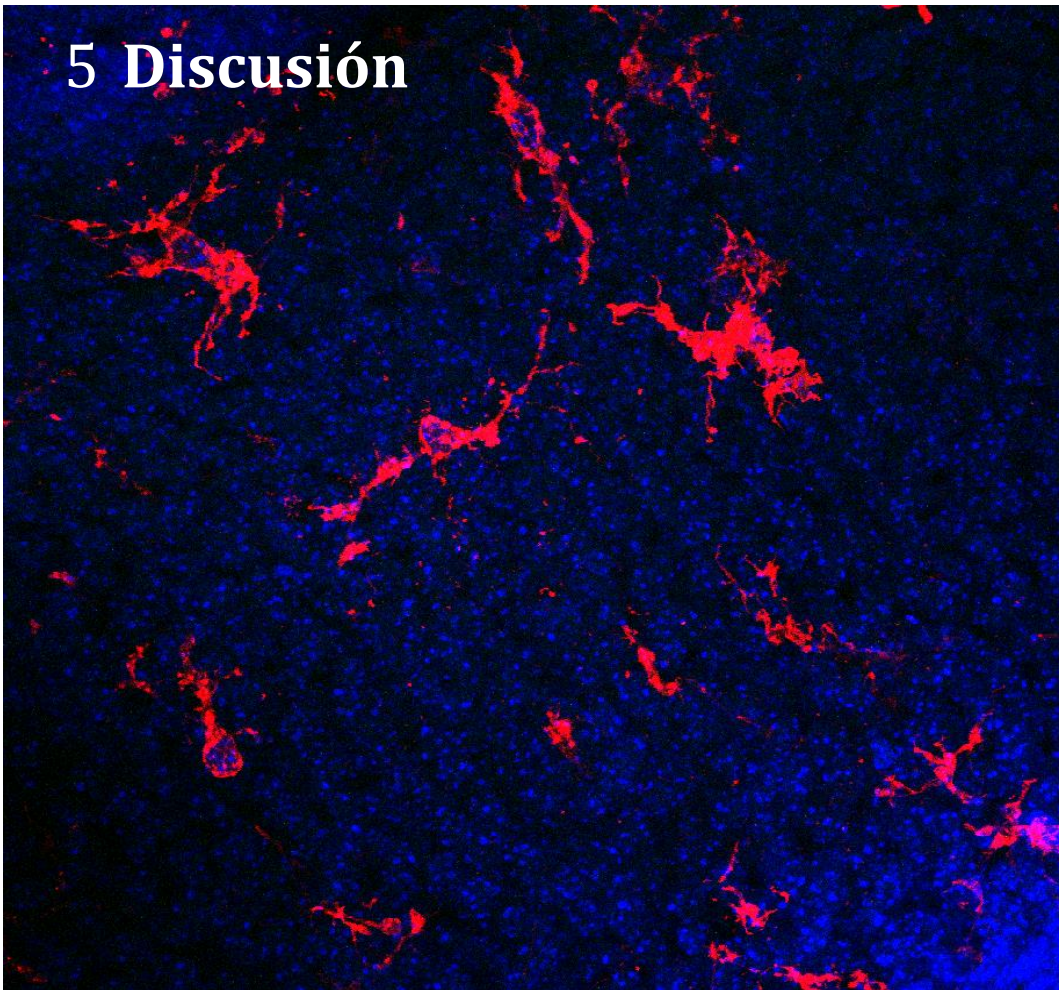


**Figura 4.79.** Hay una alteración fisiológica en las retinas de los ratones adultos deficientes en LAP. Tinción con faloidina y DAPI (a.) de RPE de ratones LAP +/+ y LAP -/- e inmunofluorescencia de GFAP (b.) y arrestina de conos (c.) en retinas montadas en plano de ratones LAP +/+ y LAP -/-. d. Inmunofluorescencia de arrestina de conos y marcaje de DAPI en secciones de ojos LAP +/+ y LAP -/-. e. Inmunofluorescencia de arrestina visual en retinas en plano de ratones LAP +/+ y LAP -/-. Barra de escala de 50  $\mu$ m





## 5 Discusión







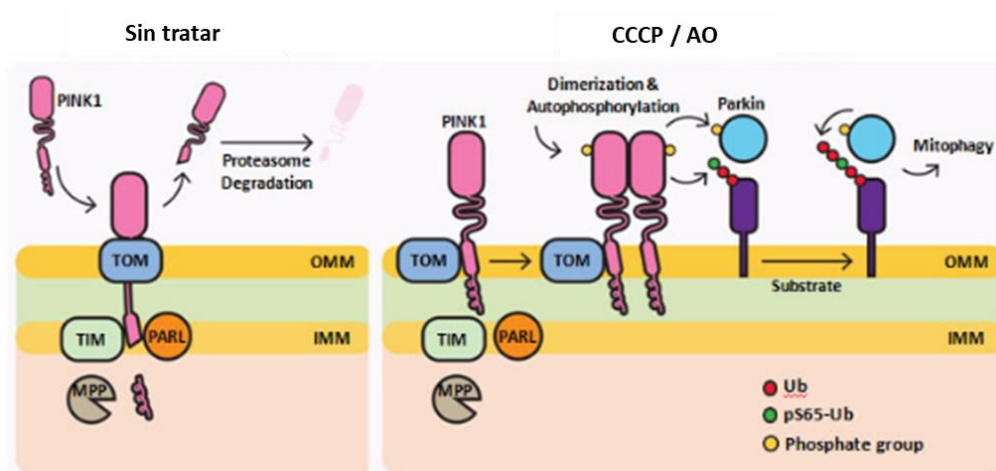
## 5.1 Papel de la mitofagia en la degeneración de fotorreceptores

### 5.1.1 Herramientas para el estudio de la mitofagia

En esta tesis doctoral, se han desarrollado y optimizado una serie de herramientas para estudiar la mitofagia. Se han usado diferentes abordajes complementarios que estudian dicho proceso en todos sus estadios, ya sea a nivel de activación o bien sobre el estado de las mitocondrias, el potencial de membrana y la morfología de éstas, etc.

Una de las herramientas que hemos utilizado ha sido la tinción con MitoTracker Deep Red (MTDR) y posterior análisis por citometría de flujo, que como se describe en el artículo [40], puede ser utilizado tanto para el estudio de mitofagia en células como en tejido disociado como la retina. La sonda MitoTracker es un catión lipófilo que incluye un grupo clorometilo y un resto fluorescente. Se concentra en las mitocondrias debido a su carga negativa que reaccionan con los tioles reducidos presentes en las proteínas de la matriz mitocondrial. Después de esta reacción, la sonda puede fijarse y permanecer en las mitocondrias independientemente de si la función mitocondrial es alterada o si el potencial de membrana mitocondrial disminuye [248], [249]. Mediante la utilización de inhibidores lisosomales, podemos obtener el flujo autofágico/mitofágico, para estudiar el ritmo de degradación mitocondrial por parte de los lisosomas. Esta herramienta nos permite estudiar la eficacia de diferentes inductores de mitofagia como son el desacoplante de la fosforilación oxidativa mitocondrial CCCP (carbonil cianuro m-clorofenil hidrazona), que reduce el potencial de membrana mitocondrial [82], [90], o bloqueando la respiración mitocondrial con una combinación de oligomicina (Inhibidor de la ATP sintetasa) y antimicina A (Inhibidor del complejo III) (AO) [122]. Todos estos tratamientos inducen la degradación selectiva de mitocondrias o mitofagia. Demostramos que la AO induce mitofagia tan solo con tres horas de tratamiento en las células SHSY-5Y (**Figura 4.1 de resultados**), que se corresponde a la lipidación de LC3 que colocaliza con las mitocondrias que se ha visto con un tratamiento de 3 horas de AO en las células HeLa-Parkin WT [90], paso previo a la degradación de las mitocondrias por los lisosomas [13], [250]. Sin embargo, las SHSY-5Y con un tratamiento de 3 horas con CCCP, no muestran cambios aparentes en mitofagia con respecto a las células sin tratar (**Figura 4.1 de resultados**), que puede ser debido a que CCCP y AO tienen diferentes mecanismos de actuación como se ha descrito anteriormente. Con un tiempo de tratamiento de 24 horas de las células SHSY-5Y

con CCCP y AO, ambos fármacos inducían mitofagia (**Figura 4.1 de resultados**). PINK1 se importa a las mitocondrias y se escinde por la proteasa PARL en el espacio intermembrana. Pero, si hay una despolarización de la membrana mitocondrial, no tiene lugar esa importación y PINK1 se estabiliza en la membrana mitocondrial externa y recluta Parkin [251] (**Figura 5.1**). Como se demuestra en el artículo [122], después del tratamiento de células con CCCP o con la combinación de A/O durante 24 horas, la cantidad de PINK1 mitocondrial aumentó drásticamente en comparación con el control, lo que podría llevar a un reclutamiento de Parkin y una activación de la mitofagia como observamos en nuestros resultados.



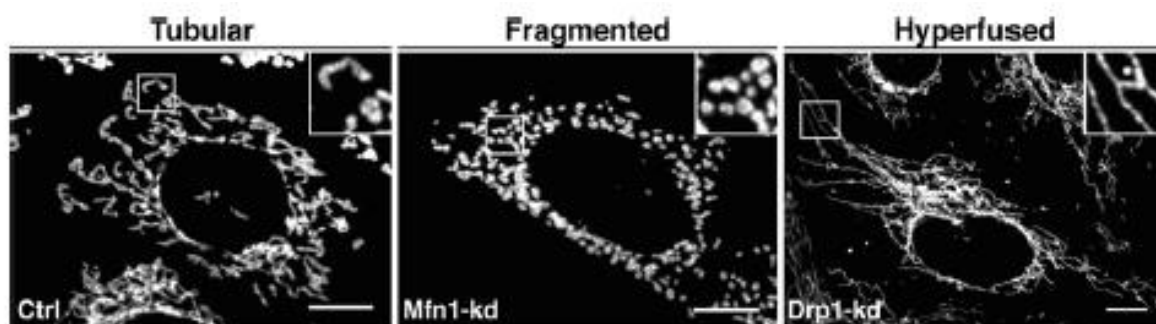
**Figura 5.1.** Mecanismo de la vía PINK1/Parkin en condiciones basales (izquierda) y condiciones inducidas por CCCP o AO (derecha).

Comparando ambos inductores, en las células SHSY-5Y, el tratamiento con AO tiene un efecto mucho más rápido en el tiempo, mientras que el CCCP actúa de forma más lenta, pero llegando a los mismos niveles de actuación de la AO. Sin embargo, en el artículo [90], utilizan normalmente la AO durante 24 horas para inducir mitofagia en las células HeLa. Pero, en este mismo artículo, utilizan la AO durante 3 horas y ven que la autofosforilación de TBK1 en Ser172, que es indicativa de la activación de TBK120, ocurre de manera dependiente de Parkin, después de un tratamiento de OA de 3 h, por lo que para una activación de la mitofagia por AO durante 3 horas es necesaria la presencia de Parkin. La diferencia es que las células HeLa no tienen Parkin endógena, pero en cambio, las células SHSY-5Y sí que expresan Parkin endógena. En cuanto a inhibidores de autofagia/mitofagia, hemos utilizado la hidroxicloroquina (HCQ), la cual eleva el pH lisosomal e inhibe la fusión entre autofagosomas y lisosomas evitando así la maduración de autofagosomas en autolisosomas, bloqueando el último paso de la macroautofagia [26]. Y

la ciclosporina (CsA), que bloquea el poro de transición de permeabilidad mitocondrial, inhibiendo la mitofagia [218]–[221]. Según los resultados mostrados, tanto a 3 como a 24 horas de tratamiento con ambos inhibidores (**Figura 4.1 de resultados**), HCQ inhibe la autofagia/mitofagia basal y la inducida por ambos inductores (CCCP y AO) en ambos tiempos, ya que el tratamiento con HCQ provoca la no colocalización de las mitocondrias con los lisosomas. Este mismo hecho sucede con otros inhibidores conocidos de autofagia como son Baf A1 (un inhibidor de la  $H^+$  ATPasa vacuolar), monensina (que media el intercambio de protones por potasio o sodio) y 3-MA. Además, la HCQ bloquea la formación de los autofagosomas [46]. Sin embargo, la CsA, está inhibiendo la mitofagia basal y la mitofagia inducida por AO, pero no la que es inducida por CCCP, por lo que concluimos que la HCQ a comparación de la CsA es mucho más constante y efectiva en todos los experimentos. En células ARPE-19 Mito-QC, hemos visto que la CsA no bloquea la mitofagia, por lo que es posible que la señal de MTDR aumente con CsA debido a una hiperpolarización de la membrana mitocondrial. Sin embargo, en retina en desarrollo, si que hemos observado que CsA bloquea la degradación de las mitocondrias [40], pero es posible que la CsA sea dependiente del tipo celular, porque observamos bastante variabilidad de actuación entre unas células y otras. La medida del flujo de mitofagia (**Figura 4.2 de resultados**) apoya que tanto CCCP como AO inducen mitofagia, pero con diferentes cinéticas, que corresponde con la cinética de estabilización de PINK1 estudiada en el artículo [122]. La degradación de proteínas mitocondriales fue bloqueada por HCQ y no por CsA, apoyando la idea de proponer HCQ como inhibidor de autofagia selectiva más potente que la CsA (**Figura 4.3 de resultados**).

Otro método que hemos desarrollado en esta tesis doctoral para el estudio de la mitofagia es la inmunofluorescencia de DNA mitocondrial (**Figura 4.4 del apartado de resultados**). Habíamos utilizado la inmunofluorescencia de diferentes proteínas mitocondriales tanto de membrana como de matriz mitocondrial, pero en ocasiones, habíamos visto variabilidad en el marcaje de unas y otras, seguramente debido al dinamismo que sufren las mitocondrias de condiciones basales a sufrir el proceso de mitofagia y debido a que cada proteína se sintetiza y se degrada con cinéticas diferentes [252]. Sin embargo, el DNAm<sub>t</sub> mostró un marcaje más estable [90]. La inmunofluorescencia con DNAm<sub>t</sub> apoyó los resultados anteriormente obtenidos por MTDR y además pudimos observar la morfología de las mitocondrias con los diferentes fármacos.

Nos llamó la atención la morfología redondeada de las mitocondrias de las células tratadas con CCCP (**Figura 4.5. del apartado de resultados**), ya que para que se produzca correctamente el proceso de mitofagia, las mitocondrias tienen que sufrir el proceso de fisión para que se separen y que adquieran la morfología fragmentada [253], que da aspecto redondeado cuando se mira por inmunofluorescencia (**Figura 5.2**).



**Figura 5.2.** Imágenes de microscopía confocal representativas que muestran los diferentes aspectos morfológicos mitocondriales del control (Ctrl), Mfn1- y células de fibroblastos embrionarios de ratón Drp1-Knockdown (Kd). Las mitocondrias están marcadas con un anticuerpo anti-TOMM20. Las mitocondrias tubulares, fragmentadas e hiperfundidas se muestran en áreas ampliadas (cuadrados blancos). Barras de escala de 10  $\mu$ m.

Es posible que veamos esta morfología con CCCP y AO no, porque el procesamiento por CCCP es mucho más lento, y aunque a 3 horas no veamos mitofagia, pero ya ha empezado la fisión, por ello se muestra esa morfología mitocondrial. O bien, el CCCP no actúa seleccionando que mitocondrias van a ser degradadas y cuales no e induce fisión de todas las mitocondrias, que sería otra razón por la que el CCCP se considera que es menos fisiológico que otros inductores de mitofagia [90].

Como herramienta más novedosa, utilizamos el reportero Mito-QC, este reportero ha sido creado en el laboratorio del doctor Ian Ganley, como es descrito en el artículo [122]. Hemos comprobado que éste un método de medición de mitofagia muy sensible y robusto, ya que cuando las mitocondrias están fusionadas, se ven fluorescentes tanto en rojo como en verde. Sin embargo, cuando se activa la mitofagia, las mitocondrias se liberan a los lisosomas donde permanece la fluorescencia mCherry estable, pero la fluorescencia de GFP se apaga por el microambiente ácido. Esto da lugar a puntos rojos que es lo que nos indica que hay mitofagia. En las células ARPE-19 Mito-QC observamos que el CCCP a 3 horas inducía mitofagia, aunque a niveles mucho más bajos que AO y deferoxamina (DFO), un quelante de hierro que inhibe las prolil hidroxilasas conduciendo a la estabilización de HIF-1 alfa [254]. A 24 horas, estos dos últimos fármacos, indujeron

mitofagia a altos niveles (**Figura 4.6 del apartado de resultados**). La quelación del hierro indujo grandes niveles de mitofagia, y es sabido que la generación de autofagosomas por este compuesto, es similar al de otros inductores de autofagia como puede ser el ayuno, pero, sin embargo, el DFO induce mitofagia de forma específica en lugar de autofagia general [122], lo que resulta en un fármaco muy atractivo para modular la mitofagia.

La herramienta del reportero Mito-QC funciona igual que nuestros sistemas de estudio de mitofagia, TOMM20 colocalizó completamente con GFP-mCherry, marcando las mitocondrias intactas (**Figura 4.7 del apartado de resultados**). En el marcaje con DNAmT vemos que hay puntos de DNA que corresponden con los filamentos de GFP y que LAMP1 colocaliza con mCherry totalmente. Por tanto, hay una colocación tanto de las mitocondrias como con los mitolisosomas, validando por tanto este sistema.

Tanto el CCCP como el DFP (deferiprona), otro quelante de hierro que actúa de la misma forma que el DFO, fueron probados en retina, tanto por citometría de flujo como en retinas Mito-QC, observando que *ex vivo* también podíamos modular la mitofagia. Aparte de las retinas, vimos que la mitofagia también la podíamos estudiar con el reportero Mito-QC en el epitelio pigmentario de la retina, ya que estamos interesados porque la retina y el RPE están intrínsecamente relacionados. El RPE realiza una función homeostática y de mantenimiento a los fotorreceptores, así como de reciclaje de los segmentos externos [147].

El DFP y el DFO son fármacos disponibles clínicamente para el tratamiento de la  $\beta$ -talasemia, y se ha visto su potencial como agentes neuroprotectores en enfermedades neurodegenerativas y proliferación de tumores [255]. Es posible, que el incremento de mitofagia que producen esté relacionada con esta función neuroprotectora, y es por ello, que planteamos al DFP, que es más potente que el DFO [122], como posible fármaco neuroprotector en procesos neurodegenerativos de la retina. Por ello, utilizamos este fármaco a lo largo de esta tesis. Ambos fármacos se ha comprobado que actúan por la vía independiente de PINK1/Parkin [122]. Una pregunta importante se refiere a cómo la pérdida de hierro desencadena la mitofagia. Se sabe que la quelación del hierro estabiliza el factor de transcripción sensible al oxígeno HIF1 $\alpha$ , a través de la inhibición de la prolina hidroxilasa involucrada en su degradación. También se ha demostrado que la hipoxia induce mitofagia a través de HIF1 $\alpha$  [256]. Se han probado diferentes ensayos para estabilizar el HIF1 $\alpha$  (incluida la hipoxia, los inhibidores de la prolina hidroxilasa, como



DMOG y  $\text{CoCl}_2$ , y la quelación del hierro). Todas las condiciones que estabilizaron significativamente HIF1 $\alpha$  también indujeron mitofagia. El gen *Bnip3* dependiente de HIF1 $\alpha$  localizado en la mitocondria actúa como un receptor de mitofagia y tiene un papel en la inducción de autofagia [257], [258]. Por tanto, se relaciona que DFP y DFO inducen mitofagia a través de la vía NIX/BNIP3 [40].

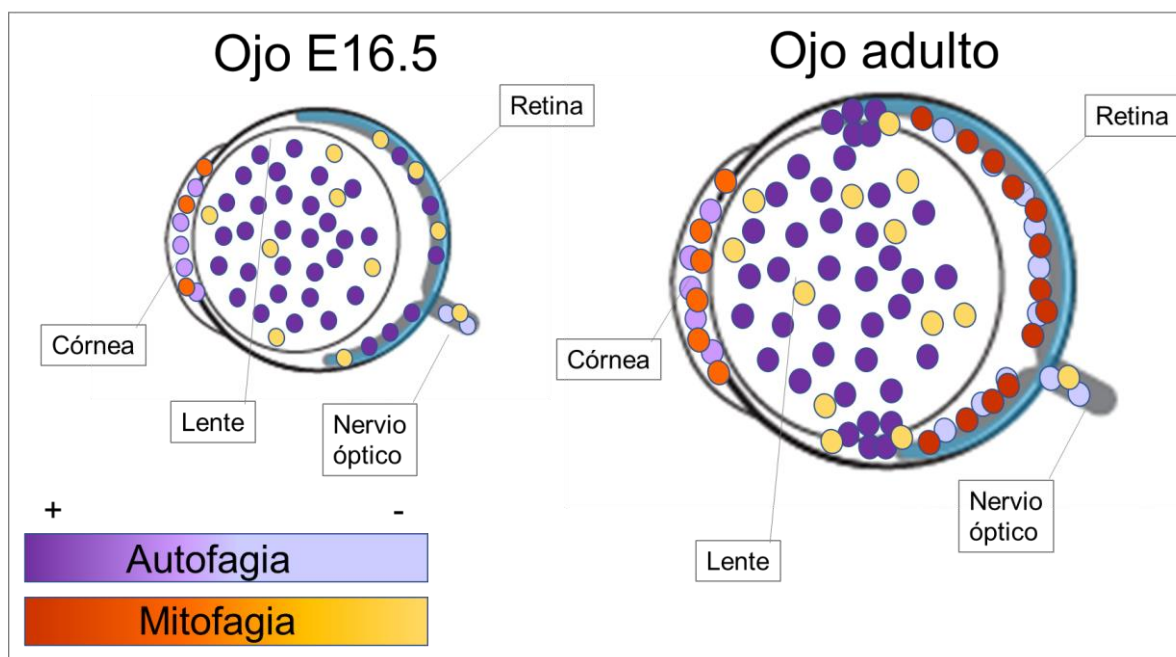
Tenemos por tanto múltiples herramientas robustas para estudiar el dinamismo de la mitofagia en células y en retina, así como su papel en esta última. Por otro lado, hemos conseguido modular la mitofagia en las retinas *ex vivo* en cultivo, lo que nos permite tratar las retinas a diferentes tiempos y con diferentes estímulos para comparar en condiciones fisiológicas.

### 5.1.2 Mitofagia y autofagia en el ojo

Para una buena función visual, la homeostasis mitocondrial es muy importante, y en ello, tiene un papel clave la mitofagia. Aunque esta relación es conocida y algunos estudios relacionan la mitofagia aberrante con la disfunción ocular, no se ha descrito la prevalencia de la mitofagia basal, o su relación con la autofagia general en el sistema visual, y nuestro trabajo aporta importantes evidencias en este sentido [223]. Como hemos visto en los resultados (**Figura 4.22 del apartado de resultados**), la mitofagia se encuentra en su mayor medida en la capa nuclear externa (CNE). Esto nos sorprende ya que las zonas donde se encuentran las mitocondrias en altos niveles es principalmente en los segmentos internos de los fotorreceptores, tanto de conos como de bastones, en las capas plexiformes donde tienen lugar las sinapsis entre las diferentes células que conforman la retina, así como en la capa de células ganglionares [222]. Pero, tanto en los segmentos externos de los fotorreceptores como en los somas de los mismos, no observamos ni se ha encontrado una presencia llamativa de mitocondrias. Comparamos estos niveles de mitofagia observados en la capa de fotorreceptores con el resto de capas de la retina así como las diferentes partes del ojo [223]. Hasta ahora, este estudio exploratorio, constituye el primer avance *in vivo* comparativo entre mitofagia y macroautofagia basales en un órgano de mamíferos. Como se ha mencionado anteriormente, algunos estudios han relacionado la mitofagia y autofagia aberrante con la patología ocular, sin embargo, se sabe poco sobre la naturaleza espacio-temporal de estos procesos dentro de este órgano. Además, no hemos encontrado ningún estudio en el que

se evalúe el estado basal de la mitofagia con respecto a los niveles de macroautofagia total ni que haga una evaluación de la mitofagia utilizando herramientas genéticas.

Hemos demostrado que la macroautofagia es un proceso significativo dentro del ojo, ocurriendo a diferentes niveles dentro de todas las regiones analizadas. En el ojo de adulto encontramos mayor variabilidad de la mitofagia en las diferentes áreas, ya que en el ojo embrionario encontramos que en todas las áreas estudiadas predomina la macroautofagia. En el ojo murino adulto, al comparar ambos modelos (Mito-QC y mCherry-GFP-LC3), la mitofagia representó una fracción mucho menor de la macroautofagia en el cuerpo ciliar y en el cristalino (**Figura 4.16, 4.19 del apartado de resultados**) en contraste con la córnea (**Figura 4.14 del apartado de resultados**) y especialmente en la retina (**Figura 4.22 del apartado de resultados**), donde se han encontrado altos niveles de mitofagia (**Figura 5.3**).



**Figura 5.3. Autofagia y mitofagia en las diferentes partes del ojo embrionario (E16.5) y ojo adulto.** La macroautofagia es un proceso significativo dentro del ojo, ocurriendo a diferentes niveles dentro de todas las regiones. En el ojo de adulto encontramos mayor variabilidad de la mitofagia en las diferentes áreas, ya que en el ojo embrionario encontramos que en todas las áreas estudiadas predomina la macroautofagia. En el ojo murino adulto la mitofagia representa una fracción mucho menor de la macroautofagia en el cuerpo ciliar y en el cristalino. En la córnea, y especialmente en la retina, se han encontrado altos niveles de mitofagia.

El modelo mito-QC sólo mide el punto final de mitofagia [122], es decir, la entrega selectiva de mitocondrias a lisosomas, pero no diferencia cual es la vía de llegada hasta la degradación, por lo que también puede estar implicada la vía no clásica de autofagia [124]. Independientemente, al usar los ratones mito-QC para monitorizar la mitofagia y los ratones

mCherry-GFP-LC3 para monitorizar macroautofagia, los datos apoyan que la mitofagia es un proceso *in vivo* que ocurre a nivel basal/fisiológico y no simplemente consecuencia del estrés o autofagia general no selectiva [78]. A partir de estas observaciones, nos surgieron diferentes preguntas, debido a esta variabilidad por zona que observamos.

Centrándonos en el ojo adulto, ¿por qué la mitofagia ocurre a una tasa tan baja en el cristalino o en el cuerpo ciliar si la macroautofagia sí que está activa? En estas zonas del ojo, parece que la macroautofagia tiene un papel más relevante, sin embargo, es posible que tenga lugar la autofagia, pero que no haya afectación de las mitocondrias. Otro aspecto que nos llamó la atención fue el porqué hay ese alto reciclaje de mitocondrias específicamente en la capa de fotorreceptores comparado con el resto de capas celulares de la retina. Este fenómeno puede explicarse ya que la mayor demanda de ATP proviene de los fotorreceptores y el RPE, que están involucrados en la fototransducción [259]. Este método de fototransducción tiene varias implicaciones para la energía en la retina. Primero, el gasto de energía en la retina es mayor en la oscuridad que en la luz, requiere actividad constante de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa [260]. De hecho, en la oscuridad, la actividad  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa representa más del 50% del gasto total de energía [260]. En segundo lugar, la rotación de cGMP consume el 13% de la energía en la luz [260]. En tercer lugar, a la luz, la restauración de cromóforos dependiente de NADPH y la fosforilación de los GPCR como la rodopsina requieren más energía [261]. Por lo tanto, es posible que estas altísimas demandas energéticas de los PR necesiten que haya un reciclaje frecuente de las mitocondrias para evitar daño al PR, que recordamos es una célula altamente especializada y que no se divide. Por otro lado, en otros estudios, se ha visto la importancia de la autofagia para el mantenimiento y buen funcionamiento de los fotorreceptores. En el artículo [262] eliminaron el gen esencial de autofagia Atg5 específicamente en bastones. La pérdida de autofagia condujo a la degeneración progresiva de los bastones a partir de las 8 semanas de edad, de modo que a las 44 semanas quedaban pocos bastones. El número de conos disminuyó ligeramente después de la degeneración de bastones, pero sí que su función disminuyó significativamente, por lo tanto, demostraron que la autofagia basal era esencial para el mantenimiento de los bastones así como para mantener los niveles óptimos de proteína de fototransducción. Por lo que la mitofagia puede tener un papel fisiológico y neuroprotector también en los fotorreceptores, ya que como hemos visto en los resultados (**Figuras 4.24-25 del apartado de resultados**), los autolisosomas también están presentes específicamente

tanto en los bastones como en los conos en comparación del resto de tipos celulares de la retina, por lo que este papel tan importante de la autofagia puede ser específico de mitofagia.

El RPE también gasta una porción sustancial de energía que soporta la función de los fotorreceptores. El RPE absorbe y degrada los discos dañados de los segmentos externos, es necesario para restaurar el fotorpigmento en conos, y gasta energía en el transporte para suministrar metabolitos a la retina [263]. Es por ello que es posible que sea necesaria la continua restauración de las mitocondrias para soportar esta alta demanda de energía.

Las células de Müller funcionan como un soporte metabólico y estructural para las neuronas retinianas internas asociadas [264]–[266] y el compartimento adyacente, en el que las células de Müller participan en el intercambio de moléculas, es decir, los vasos sanguíneos de la retina, el cuerpo vítreo y el espacio subretiniano. Como se ha mostrado en los resultados (**Figura 4.35 del apartado de resultados**), en la glía de Müller también encontramos un elevado número de mitolisosomas como de autolisosomas. Como varias funciones de las células de Müller son cruciales para la homeostasis de la retina interna, y la mayoría de ellas requieren energía, hemos pensado que es posible que un elevado reciclaje mitocondrial es necesario para dar el necesario soporte de energía [267]. Por tanto, hay una elevada mitofagia en RPE, fotorreceptores y glía de Müller, donde hay una alta demanda energética.

### Hay un transporte axonal de los mitolisosomas desde los segmentos internos de los fotorreceptores hasta la CNE

Como se ha destacado anteriormente, encontramos unos niveles elevados de mitofagia en la capa nuclear de fotorreceptores, y encontramos mitolisosomas tanto en los axones como en los somas. Este hecho nos sorprendió, ya que la mayor densidad de mitocondrias en la retina se observa en el segmento interno de los fotorreceptores. Se piensa que las mitocondrias se acumulan ahí ya que tienen que estar cerca de la vasculatura que es de donde obtienen el oxígeno. Con los marcadores de TOMM20 y COXIV (**Figuras 4.29 y 4.30 del apartado de resultados**), corroboramos que la mayoría de las mitocondrias están en el segmento interno de los fotorreceptores, las capas plexiformes y las células ganglionares, como se describe en [205]. En la CNE también hay mitocondrias, pero no en

tan altos niveles, y no todos los mitolisosomas coinciden con las mitocondrias (**Figura 4.31 del apartado de resultados**). Además, dado que los puntos rojos están indicando mitolisosomas, significa que la mitocondria ya está dentro del lumen del lisosoma, por lo que ha podido empezar el proceso degradativo, así como no estar expuestos los epítomos de estas proteínas por estar en el interior de otro orgánulo.

Todos estos fenómenos nos llevaron a plantear la hipótesis de que tiene que haber un transporte de las mitocondrias dañadas a la capa nuclear o bien de los mitofagosomas o mitolisosomas. El transporte axonal es un proceso esencial en las neuronas debido a la extrema polaridad y tamaño de estas células. El transporte axonal mantiene a los axones y terminales nerviosas abastecidas con proteínas, lípidos y mitocondrias, y elimina las proteínas recicladas o mal plegadas para evitar la acumulación de agregados tóxicos [268]. Además de su papel en el metabolismo neuronal, el transporte axonal es crucial para la transmisión neural intracelular y permite que la neurona responda eficazmente a las señales tróficas o al estrés [268]. El deterioro del transporte axonal ha surgido recientemente como un factor común en varios trastornos neurodegenerativos [268]. Se ha descrito que las cargas vesiculares, como los lisosomas, y otras estructuras vesiculares como los autofagosomas realizan movimientos axonales, que facilita la fusión de lisosomas con vesículas LC3 [269].

Dado que los autofagosomas sufren eventos de fusión múltiple con lisosomas para la degradación completa [270], la maduración completa de autolisosomas que contiene lisosomal activado es más probable que ocurran cuando las vacuolas autofágicas se transportan a regiones proximales de axones o al cuerpo celular donde están los lisosomas concentrados. La inhibición de la acidificación lisosómica o inhibición de las catepsinas deteriora selectivamente el transporte axonal de catepsina que contienen las vesículas [234]. En el cuerpo celular de las neuronas es donde hay más lisosomas como se ha mencionado anteriormente, lo que hace que en esta zona la fusión vesículas LC3-lisosomas sea más eficiente (es decir, la eliminación completa del autofagosoma) [270]. Estos movimientos vesiculares en los axones, no están descritos en los fotorreceptores, que son también neuronas, pero no son neuronas comunes.

En nuestros resultados, observamos que, en condiciones basales (retinas de ratones sin tratar), en cuanto a retina externa se refiere, los lisosomas se encuentran extendidos por

toda la capa nuclear externa (**Figura 4.32 del apartado de resultados**) y coinciden con los mitolisosomas que observamos en la CNE. Debido a que el mayor número de mitocondrias no se encuentra en la capa nuclear, pensamos que puede estar sucediendo un transporte vesicular o de orgánulos axonal. Como está descrito [234], bien la inhibición de las catepsinas o bien una alteración en la acidificación del lisosoma, altera este transporte axonal. Lo que observamos en nuestros resultados, es que cuando tratamos a los ratones con leupeptina, que inhibe las catepsinas, los mitolisosomas que veíamos en la capa nuclear externa, se quedan en la parte más baja de los segmentos internos de los fotorreceptores, donde llegan las conexiones de las células de Müller (**Figura 4.32 del apartado de resultados**). En esta zona, está descrito que hay acumulación de mitocondrias en condiciones basales (**Figura 1.21 del apartado de introducción**), al igual, que como observamos en el ratón mCherry-GFP-LC3, LC3 está distribuido en su mayoría por los segmentos internos así como en la zona sináptica de las células de Müller (**Figura 4.33 del apartado de resultados**). Todo ello, nos lleva a plantear un transporte axonal de los lisosomas. En condiciones basales, la mayor abundancia de lisosomas se encuentra en el cuerpo celular y axones de los fotorreceptores, así mismo, es donde se encuentran niveles elevados de mitofagia, sin embargo, la mayor abundancia de mitocondrias la vemos en la parte más superior de la CNE. Planteamos la existencia de un transporte axonal de los lisosomas a la zona apical de la CNE, donde se estarán formando los mitofagosomas con más probabilidad, ya que se encuentran en abundancia tanto las mitocondrias como LC3. En esta zona, es donde el lisosoma se fusionaría con el mitofagosoma, posteriormente transportándose de nuevo ya como mitolisosoma a los axones y cuerpo celular de los fotorreceptores, donde hay una gran cantidad de lisosomas para llevar a cabo la degradación completa, ya que para ello, es necesario la fusión múltiple con lisosomas [270].

Al bloquear con leupeptina, observamos un acúmulo de mitolisosomas en la parte superior de la CNE. La leupeptina inhibe la función de las catepsinas, por lo que los lisosomas no son funcionales y como se ha descrito antes, se ve alterado el transporte axonal. Por lo que los únicos mitolisosomas que vemos, son los lisosomas que se encontraban en la parte superior de la CNE para fusionarse con los mitofagosomas, pero se ve alterado su transporte de nuevo a la CNE, ya que los lisosomas presentan un transporte bidireccional [234].



Cuando ponemos a los ratones en condiciones de ayuno, y posteriormente les tratamos con leupeptina, observamos ese bloqueo de transporte axonal, observando una acumulación de mitolisosomas en la parte superior de la CNE (**Figura 4.32 del apartado de resultados**) y a su vez, un mayor número de mitolisosomas en la CNE, ya que anterior al tratamiento de leupeptina, habíamos inducido ayuno, que aumenta por tanto la mitofagia, y con el bloqueo de las catepsinas, no llega a degradarse el material, por lo que podemos ver el flujo de autofagia.

Por tanto, proponemos que hay un transporte axonal en la retina externa de los lisosomas y de los mitolisosomas necesario para que se lleve a cabo la degradación completa de las mitocondrias para la obtención de la energía necesaria para el metabolismo de los fotorreceptores. Esto nos abre una gran línea de investigación para confirmar esta teoría, como puede ser el uso de otros inhibidores lisosomales, como la bafilomicina, que basicifica el lumen lisosomal, para ver si resulta en el mismo fenotipo, así como la tinción con LC3 para observar si tanto los mitolisosomas como los autofagosomas se quedan acumulados. Por otro lado, también confirmaríamos esta teoría realizando un estudio *in vivo* del transporte lisosomal mediante microscopía de dos fotones de fotorreceptores, para mediante *timelapse* seguir el movimiento vesicular y confirmar nuestra hipótesis.

### 5.1.3 La mitofagia en el modelo farmacológico de degeneración de fotoreceptores, estudio con N-Methyl-N-nitrosourea (MNU)

#### MNU: Modelo farmacológico de Retinosis Pigmentosa

Utilizando la herramienta del reportero Mito-QC se nos abría un amplio abanico de posibilidades para estudiar el posible papel neuroprotector de la mitofagia. Estudiamos diferentes formas de abordarlo, y lo más lógico fue emplear como prueba de concepto, por ejemplo, un modelo farmacológico con N-Methyl-N-nitrosourea (MNU) como modelo de degeneración de fotorreceptores. El MNU ha sido descrito como un agente alquilante que induce específicamente muerte de los fotorreceptores a través de un mecanismo apoptótico [200] y ha sido utilizado como modelo de retinosis pigmentaria (RP) [271], [272]. Este es un buen modelo de estudio, ya que se sabe que causa estrés oxidativo aumentando las especies oxidativas como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o ROS [200], induce la acumulación de iones Ca<sup>2+</sup> dentro de la célula, lo que resulta que activa la calpaína-2 y conduce a la apoptosis [203],

mecanismos asociados a la degeneración de los PR en la retinosis pigmentaria [51], [188], [236].

Estudiamos el efecto del MNU en los ratones C57BL/6J tras un día de tratamiento, antes de que haya altos niveles de muerte celular, ya que en estudios previos del laboratorio, habíamos observado que con un tratamiento de 3 y 5 días el MNU ya había causado un gran daño, habiendo perdido ya a 5 días de tratamiento la mitad de la capa nuclear externa (**Figuras 4.36 y 4.37 del apartado de resultados**).

Con un día de tratamiento se produce una desorganización de los núcleos de los fotorreceptores, pero solo observamos una pérdida significativa de ellos en la zona central de la retina, ya que la degeneración de fotorreceptores suele sufrir una degeneración central-periférica [273] (**Figura 4.38 del apartado de resultados**). Sin embargo, vemos niveles elevados de TUNEL en la CNE (**Figura 4.39 del apartado de resultados**). Esto nos puede indicar que hay una gran muerte y que estaríamos en niveles avanzados de degeneración, pero la realidad, es que al igual que sucede en el rd10 a p25 que hay un pico de muerte, entre las 18 y 24 horas de tratamiento del MNU sucede el pico de muerte de fotorreceptores [204], momento idóneo para el estudio de la mitofagia, ya que están presentes todas las señales de daño, pero no hay disminución masiva de la capa de fotorreceptores.

Las células de Müller representan aproximadamente el 90% de la población glial de la retina, y se extienden a lo largo de todo ella para interactuar con todos los tipos celulares de la retina. Junto con los astrocitos, estas células desempeñan una variedad de funciones fisiológicas y de mantenimiento estructural de la retina, entre los que están la protección frente al estrés oxidativo [264]. En diversas distrofias y lesiones retinianas se produce una activación de la GM caracterizada por un aumento de la expresión de la proteína GFAP (del inglés *Glial fibrillary acidic protein*), considerada señal de identidad de gliosis reactiva. Sin embargo, se ha postulado que la activación de la GM contribuye a la muerte de fotorreceptores [237].

Lo que observamos en las retinas de C57BL/6J tratados con MNU durante un día, fue que hay una gliosis reactiva, ya que la activación de la GM ante un daño es uno de los procesos que se dan primero [274]. Si bien adquiere un papel protector, también, si la reactividad de células gliales de Müller se prolonga, estas mismas células pueden ser

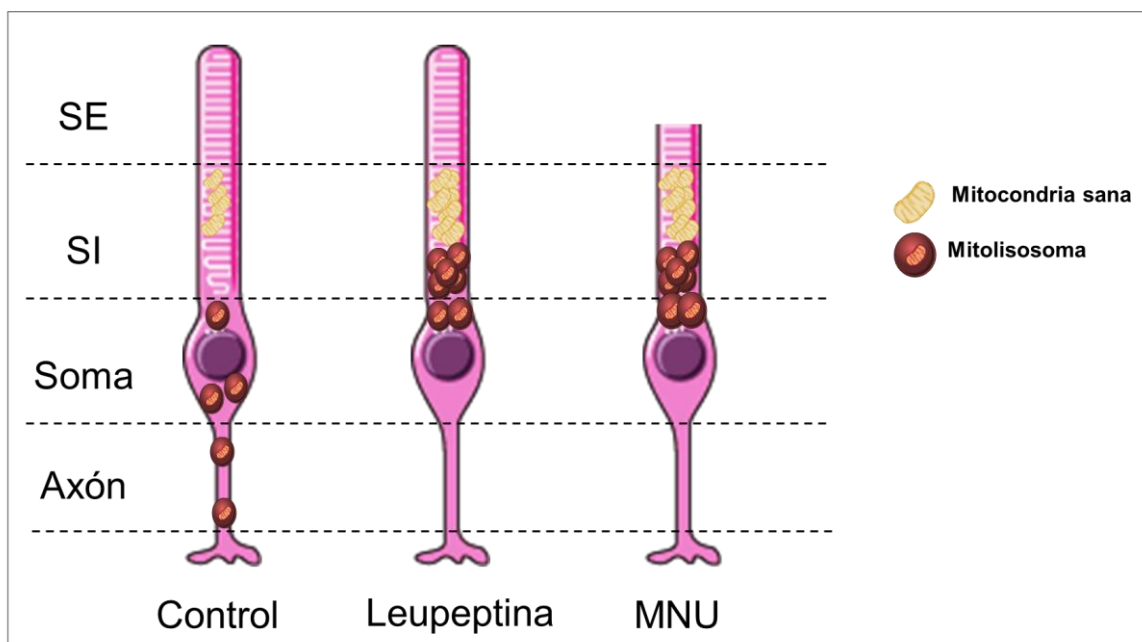
perjudiciales para el tejido neuronal y acelerar neuronal muerte a través de interacciones con células microgliales y monocíticas. Por ejemplo, estudios en la retina mostraron que las células de Müller secretan TNF- $\alpha$ , lo que aumenta la expresión de factores inflamatorios, que promueven la infiltración de microglía en la neuroretina [275]. También se sabe que la glía reactiva proporciona un armazón celular adhesivo que guía el movimiento de la microglia residente a través de varias capas retinianas en el retina lesionada [276]. Es por ello, que aunque la gliosis reactiva sea un mecanismo en principio neuroprotector, puede perjudicar a largo plazo al tejido e incrementar de una manera más rápida la muerte producida por el MNU. Por lo tanto, la muerte de fotorreceptores provocada por el MNU no sabemos si es a causa de la Glía de Müller, la propia muerte de fotorreceptores, la afectación del RPE o un sumatorio de todos ellos.

### Un día de tratamiento con MNU, inhibe la mitofagia en la capa nuclear externa y produce acumulación de mitolisosomas en la parte superior de la CNE

Los ratones Mito-QC tratados con MNU durante un día presentaron una disminución de mitofagia en la CNE (**Figura 4.40 del apartado de resultados**), pero sin embargo se encontraron mitolisosomas en la parte superior de esta capa, donde anteriormente habíamos observado los mitolisosomas acumulados en el tratamiento de los ratones con leupeptina. Esta disminución de la mitofagia, no sabemos si es consecuencia o causa de la degeneración de los fotorreceptores de MNU. Sabemos que el estrés oxidativo a bajo nivel puede promover la biogénesis mitocondrial y la eliminación o reparación de las mitocondrias dañadas por mecanismos como la mitofagia, mientras que el estrés oxidativo de alto nivel más allá de la capacidad celular para reparar o eliminar el daño oxidativo puede conducir a la acumulación de mitocondrias dañadas [277]. Estas mitocondrias dañadas llevarían a sumar más estrés oxidativo del inducido con MNU, perjudicando por otro lado el buen funcionamiento celular. Ante un daño de estrés oxidativo, las mitocondrias despolarizadas o fragmentadas no pueden fusionarse nuevamente en el conjunto funcional de mitocondrias, entonces la mitofagia se llevará a cabo como un mecanismo de protección para evitar la propagación del daño en la red mitocondrial [278]. Es por ello, que nos planteamos, que ante un primer daño de las mitocondrias, la mitofagia tiene un papel crucial en su eliminación, sin embargo, cuando este daño es prolongado, como el daño del MNU, bien, es posible que la vía de la mitofagia se vea afectada, que es posible ya que hemos visto que se incrementa la expresión de TOMM20 cuando disminuye

la mitofagia, o bien que al estar las mitocondrias dañadas y no haber biogénesis mitocondrial, hay una falta de energía para que se lleve a cabo la mitofagia.

Por otro lado, vemos un fenotipo muy parecido al que presentan las retinas de los ratones Mito-QC inyectados con leupeptina (**Figura 5.4**), lo que nos puede llevar a pensar que el MNU es posible que cambie el pH de los lisosomas o bien altere su membrana o el funcionamiento de las catepsinas, lo que disminuiría la fusión mitofagosoma-lisosoma, disminuyendo la mitofagia e inhibiendo el transporte de lisosomas axonal.



**Figura 5.4. Localización de las mitocondrias y de los mitolisosomas comparando el modelo control, leupeptina y MNU.** Cuando los ratones son tratados con leupeptina y MNU, los mitolisosomas se sitúan en la parte inferior de los segmentos internos de los fotorreceptores, donde la glía de Muller realiza la sinapsis. Es posible, que el MNU, al igual que la leupeptina, inhiba la función del lisosoma y por lo tanto inhiba el transporte lisosomal axonal. SE: Segmentos externos; SI: Segmentos internos.

Se ha descrito, que el estrés oxidativo puede influir en la permeabilidad de la membrana lisosómica induciendo una agregación de las proteínas de la membrana lisosómica [279]. Esta agregación parcial de las proteínas de la membrana lisosómica da como resultado un aumento de la permeabilidad de los protones al lisosoma y con ello un aumento en el pH luminal, lo que llevaría a la disfuncionalidad de los lisosomas [279]. Por otro lado, hemos observado que el MNU afecta a los conos y bastones, y que en los conos, produce la pérdida de los axones, donde se encuentran una gran cantidad de lisosomas, otro motivo más por el que es posible que disminuya la mitofagia en la CNE, ya que cuando hacemos la inmunofluorescencia del anticuerpo anti-Lamp1 en la retina, las retinas con

MNU muestran ausencia de lisosomas en la CNE, bien porque son disfuncionales y se ha alterado la exposición de LAMP1, bien porque las estructuras donde se encuentran han sido dañadas o bien debido al transporte axonal (**Figura 4.42 del apartado de resultados**). Este estudio nos ha creado muchas preguntas que iremos abordando en el desarrollo del proyecto y en futuras investigaciones.

Los mitolisosomas en las retinas con MNU se encuentran tanto en los somas de los conos como de los bastones, pero en su parte apical. Al igual, se encuentran en la glía de Müller, la cual, con el tratamiento de MNU, rodea más los núcleos de los fotorreceptores y esto es posible que como se ha mencionado anteriormente, en condiciones patológicas, los procesos gliales ayudan a llenar los "agujeros" que quedan al morir los fotorreceptores y participan en la formación de "anillos", que parecen prolongar la supervivencia de los fotorreceptores de conos restantes [234]. Si bien nos fijamos en las consecuencias que tiene el MNU en los conos y en los bastones (**Figuras 4.43 y 4.44 del apartado de resultados**), observamos que hay una disminución de ambos, una pérdida de los somas de los conos así como una desorganización de los segmentos de los bastones, ya que hay un elevado nivel de estrés oxidativo que llevaría a esta atrofia [200], al igual que se observa la pérdida de las proteínas rodopsina (bastones) y arrestina de conos (conos) por western blot [204].

Por tanto, concluimos que hay una disminución de la mitofagia en la CNE con el MNU, que bien, puede ser consecuencia del daño o, a su vez, su disminución puede incrementar este daño. Planteamos por tanto que la mitofagia puede ser un mecanismo protector, que se activa ante un determinado daño y que si se bloquea genera más daño. Es por ello que lo comprobamos *in vitro*, para aclarar cuál es el papel tan específico que está teniendo la mitofagia en la CNE.

### **El MNU causa un daño tiempo-dosis dependiente, afectando a diferentes orgánulos de la célula**

Tenemos muchas hipótesis sobre lo que está causando el MNU en los fotorreceptores, y es por ello que dimos tanta importancia a estudiar su mecanismo molecular. Para ello se utilizaron las células ARPE-19, que son células derivadas de epitelio pigmentario humano, no transformadas y no tumorales. Es sabido que la retina y el RPE están intrínsecamente relacionados, proporcionando el RPE una función homeostática y de mantenimiento de los fotorreceptores, así como de reciclaje de los segmentos externos.

Alteraciones en el RPE, puede producir la degeneración de los fotorreceptores [147]. El MNU produce muerte dependiente de dosis y de tiempo en las células ARPE-19 (**Figura 4.46 del apartado de resultados**) así como el daño en el DNA también sigue la misma cinética (**Figura 4.47 del apartado de resultados**). Se sabe que el MNU causa apoptosis por la restricción de la formación de aductos de ácido desoxiribunocleico en los núcleos [204]. La degeneración inducida por MNU está acompañada por la regulación positiva de la proteína Bax, la regulación negativa de Bcl-2 y la activación de la familia de genes caspasa [201], [203]. Por lo tanto, como respuesta a este daño oxidativo, aumentan los niveles de Hsp70, que a su vez, aumentan la expresión de Bcl-2 antiapoptótico [280]. Sin embargo, bajo el tratamiento con MNU, parece que este sistema no es suficiente para prevenir la apoptosis celular según va incrementando la dosis y el tiempo, ya que va aumentando el daño celular y, sin embargo, en la dosis más baja de MNU aplicada durante un tiempo corto, hay una recuperación de viabilidad celular en respuesta a un primer daño.

Por microscopia electrónica (**Figura 4.48-4.52**), se observó que según se iba aumentando la dosis de MNU, el daño en las células ARPE-19 iba siendo mayor. Se observó una mayor desorganización del citoplasma, así como, a la dosis de 500 µg/ml de MNU se vio que había acúmulos de orgánulos, pero también muchos espacios en el citoplasma sin orgánulos. La vacuolización del citoplasma también iba en aumento, así como las crestas mitocondriales iban desapareciendo y perdiendo consistencia. El retículo endoplasmático, por otro lado, se iba engrosando, por lo que nos llevó a pensar que el MNU, causaba estrés de retículo endoplasmático. El retículo endoplásmico es un orgánulo con múltiples funciones. La síntesis de proteínas transmembrana y proteínas que van a secretarse, se dan en este orgánulo. Muchas afecciones que imponen estrés a las células, incluidas hipoxia, ayuno, estrés oxidativo e infecciones promueven el estrés del retículo endoplásmico [281]. Perturbaciones en muchos procesos homeostáticos conducen a un estado en el que el buen plegamiento de las proteínas disminuye (estrés ER). La posterior acumulación de proteínas mal plegadas o desplegadas indica problemas en la homeostasis celular que frecuentemente suelen terminar en muerte celular [282]. Por lo que aparte de la propia muerte provocada por el MNU, esta muerte se ve apoyada por todas las afectaciones que produce en los orgánulos el MNU. Nos sorprendió el hecho de que los lisosomas por microscopía electrónica no se veían aparentemente afectados por el MNU, pero la



microscopía electrónica solo nos da información sobre alteraciones morfológicas y no funcionales.

Con estas mismas dosis de MNU, observamos que ante un daño menor, la mitofagia se incrementaba (**Figura 4.54 del apartado de resultados**), ya que ante una alteración ocasionada por estrés oxidativo, donde las mitocondrias van a dejar de ser funcionales y van a generar ROS, la mitofagia se activa [278] y posteriormente, a dosis altas de MNU, la mitofagia se inhibe, dosis en la que hay una mayor desorganización celular así como muerte apoptótica, coincidiendo con lo que sucede en las retinas de los ratones tratados con MNU durante un día. Por lo que el incremento o disminución de la mitofagia depende de la dosis de MNU.

Una de nuestras suposiciones era que el MNU causaba inhibición de la mitofagia por alteración bien de las catepsinas lisosomales o bien por un cambio de pH. Observamos que hay una alteración del pH de los lisosomas (**Figura 4.56 del apartado de resultados**) así como una alteración de la catepsina B, lo que nos lleva a pensar que el MNU sí que reduce la funcionalidad de los lisosomas, reduciendo por tanto, tanto la mitofagia como el transporte axonal, ya que para que se lleve a cabo la degradación de mitocondrias, la fusión del mitofagosoma y mitolisosoma, y el transporte axonal, es necesario el mantenimiento del pH ácido y el buen funcionamiento de las catepsinas [234]. Queda por lo tanto por determinar la actividad del lisosoma en estas condiciones utilizando, por ejemplo, sustratos de la actividad catepsina como el Magic Red.

### El MNU induce mitofagia a través de la vía dependiente de PINK1/Parkin

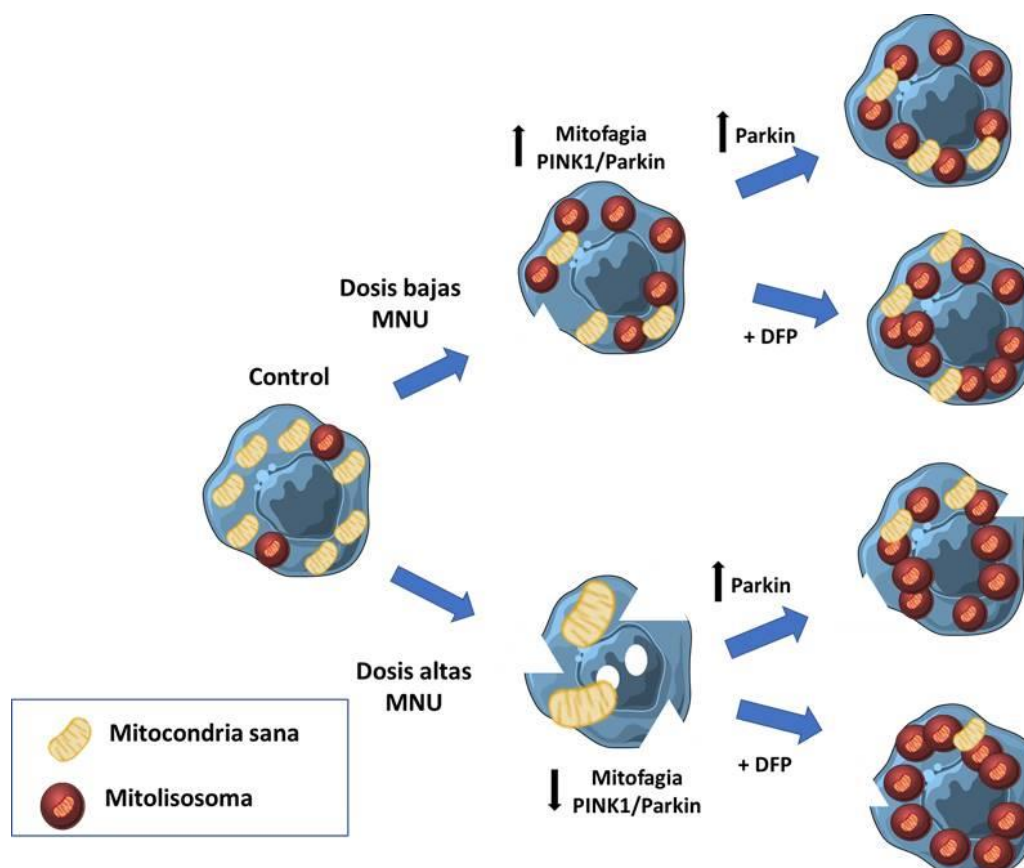
El MNU a dosis bajas produce un incremento de mitofagia en respuesta al daño, que posteriormente se inhibe cuando el daño se incrementa (**Figura 5.5**). La vía por la que el MNU modula mitofagia es la vía dependiente de PINK1/Parkin que se desarrolla en el apartado 1.2.2.3. de la introducción. En las células ARPE-19 Mito-QC NIX KO observamos mitofagia (**Figura 4.57 del apartado de resultados**), por lo que esta molécula actúa por una vía independiente de NIX. Además, en las dosis baja y media de MNU, donde se observa incremento de mitofagia, hay una estabilización de PINK1 por parte del MNU (**Figura 4.58 del apartado de resultados**), y se desestabiliza en la dosis mayor, por ello se produce la inhibición de la mitofagia ante un daño mayor de MNU.

Una de las proteínas más sensibles a la oxidación es Parkin y la creciente evidencia sugiere que Parkin es importante para proteger las células del estrés oxidativo [283], [284]. Por lo que la activación de esta vía por el estrés oxidativo causado por el MNU estaría relacionada. Mecanismos por los cuales se producen mutaciones de pérdida de función en PINK1 y Parkin se han visto relacionados con la enfermedad de Parkinson, en la cual la deficiencia de Parkin o PINK1 disminuye la mitofagia y provoca una acumulación de mitocondrias disfuncionales que de otro modo se eliminarían, lo que llevaría a un aumento de ROS y a la eventual neurodegeneración de células susceptibles [116]. Este suceso estaría pasando con el tratamiento de MNU a dosis altas. Por lo tanto, hipotetizamos que el MNU induce (dosis menores) e inhibe (dosis mayores) la mitofagia por la vía dependiente de PINK1/Parkin.

### La mitofagia inducida por DFP rescata la neurodegeneración de los conos producida por MNU

Demostramos que una activación de la mitofagia protege a los conos frente al daño producido por el MNU. En células ARPE-19 donde se sobreexpresa Parkin, hay un retraso de la muerte producida por el MNU (**Figura 4.59 del apartado de resultados**) (**Figura 5.5**). El aumento de Parkin estaría interrelacionado con que PINK1 pueda reclutar a la membrana de la mitocondria más Parkin, y por lo tanto llevar a una mayor activación de la mitofagia que ante un efecto normal del MNU. Este efecto se produciría en mitocondrias dañadas, un incremento de la mitofagia ayudaría a eliminarlas y así disminuir la generación de ROS, implicado en acelerar la muerte de fotorreceptores por apoptosis [202]. Cuando el daño del MNU es mayor, quizás la maquinaria de mitofagia, aunque se sobreexpresen las proteínas implicadas en ella, no es capaz de funcionar adecuadamente, por lo que se puede proponer la mitofagia como un tratamiento pre-neurodegeneración, para evitar que se llegue a unos límites elevados de la neurodegeneración. El MNU también está implicado en la peroxidación de los lípidos, lo que provoca una afectación de las membranas celulares, que puede provocar la ausencia de proteínas de membrana implicadas en las vías de mitofagia [200]. Esta peroxidación de los lípidos de membrana afecta al reciclaje de los segmentos de los fotorreceptores, produciendo una atrofia y un aumento de ROS.

Por otro lado, hemos descubierto que la mitofagia protege a las células ARPE-19 (**Figura 5.5**) y a los conos del daño producido por MNU (**Figura 5.6**).



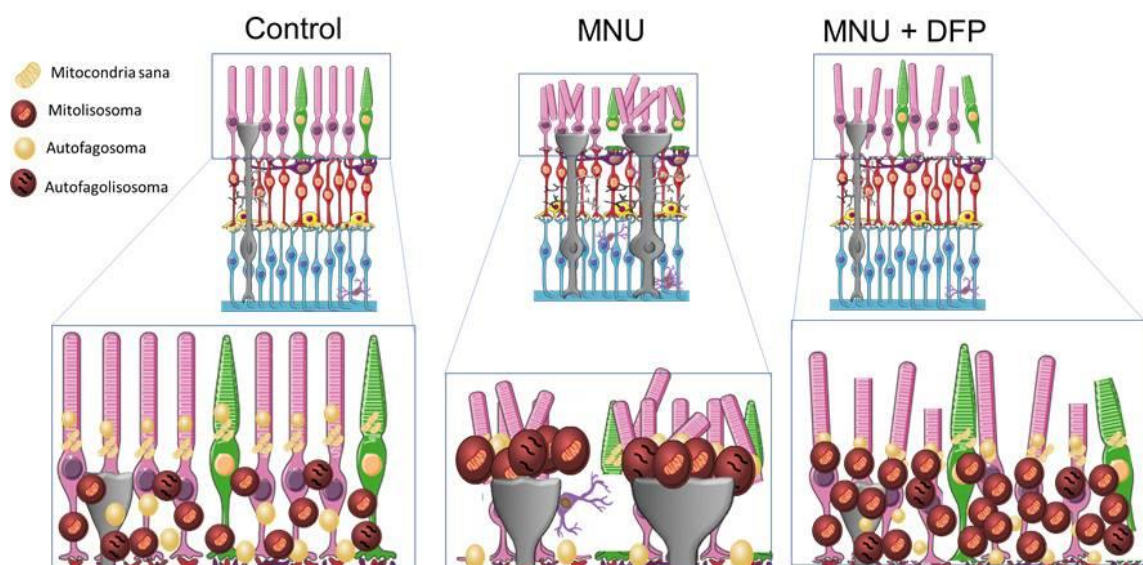
**Figura 5.5. Efecto del MNU según su dosis.** Dosis bajas de MNU inducen mitofagia, mientras que dosis altas, la inhiben. Un incremento de la mitofagia dependiente de PINK1/Parkin por sobreexpresión de Parkin y un incremento de la mitofagia dependiente de NIX/BNIP3 con DFP, recupera a las células ARPE-19 del daño provocado por MNU a diferentes dosis.

Utilizamos DFP como fármaco potente para inducir mitofagia, ya que se ha comprobado que tiene un gran efecto por la vía independiente de PINK1/Parkin [122]. El tratamiento de células con CCCP o con la combinación de oligomicina/antimicina, la cantidad de PINK1 mitocondrial fue aumentado dramáticamente en comparación con el control. Por el contrario, no hubo aumento en PINK1 con tratamiento DFP lo que sugirió que la vía PINK1/Parkin no se activa por la quelación de hierro [122]. Se sabe que la quelación de hierro estabiliza el factor de transcripción HIF1 $\alpha$ , a través de la inhibición de la prolina hidroxilasa implicada en su degradación. La hipoxia también ha sido demostrada de inducir mitofagia a través de HIF1 [256]. HIF-1 es un heterodímero compuesto de HIF-1a sensible al oxígeno y subunidades HIF-1b expresadas constitutivamente. Bajo condiciones de normoxia, la subunidad HIF-1a se degrada rápidamente por la vía ubiquitina - proteasoma después de la hidroxilación de residuos de prolina por HIF prolil-4-hidroxilasas [285]. La actividad funcional de PHD (prolyl hydroxylation domain protein), es dependiente del oxígeno molecular. Se ha visto por ejemplo que durante la separación de

los fotorreceptores del RPE, la PHD es menos activa, lo que conduce a la inhibición de la degradación de HIF1 $\alpha$ , lo que induce la expresión de genes como pro mitofagicos, como NIX y BNIP3. Este paso es esencial para que se active la mitofagia [40], [286].

Diferentes fármacos que han estabilizado HIF1 $\alpha$ , han inducido también mitofagia. Como el fármaco DFP, que estabiliza HIF1 $\alpha$ , el cual está interrelacionado con BNIP3 e induce mitofagia por esta vía. Aunque MNU estabilice PINK1 y module la mitofagia por la vía dependiente de PINK1/Parkin, hemos visto, que un incremento de mitofagia por la vía BNIP/NIX retrasa la neurodegeneración de los fotorreceptores provocada por MNU, ya que un aumento de mitofagia, sea una vía u otra, siempre va a suponer un reciclaje de los orgánulos dañados, así como una disminución de ROS. Como se ha demostrado en [287], un inhibidor de la PHD, estabilizó HIF1 $\alpha$  y es eficaz para disminuir la muerte celular fotorreceptora después de la separación de la retina del RPE al reducir la generación de ROS. Además, confirmaron que la activación de la autofagia por la estabilización de HIF1 $\alpha$  fue mitofagia, mecanismo similar a como actúa el DFP.

Por tanto, proponemos la mitofagia como una posible terapia para la neurodegeneración de fotorreceptores. Inductores de mitofagia como el DFP recuperan de la degeneración de los conos (**Figura 5.6**).



**Figura 5.6. La mitofagia neuroprotege a los fotorreceptores.** Los mitolisosomas y los autolisosomas, en condiciones basales se encuentran distribuidos por la CNE, sin embargo, al ser tratados con MNU, se acumulan en la parte inferior de los SI, en la zona sináptica de la glía de Müller. Además, produce una pérdida tanto de bastones como de conos. Cuando se induce un incremento de mitofagia, se incrementa la supervivencia de los fotorreceptores.

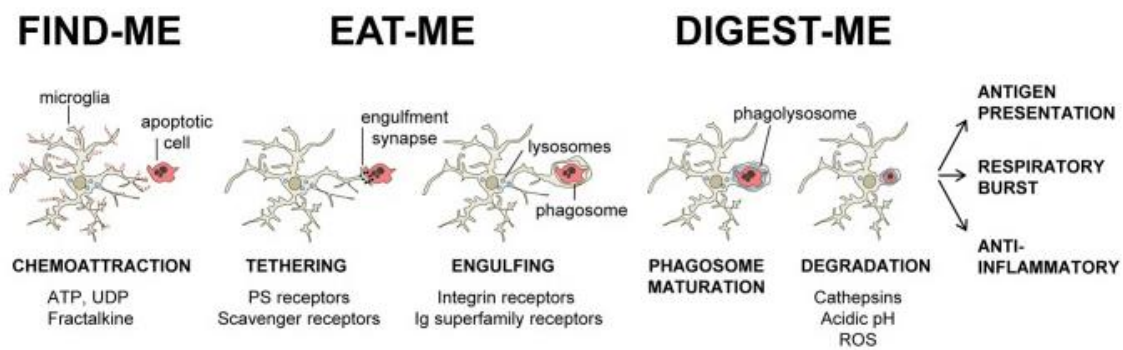
Nos queda por avanzar en el proyecto, probando incrementar la mitofagia por otras vías y comparando diferentes fármacos, así como viendo si un incremento de mitofagia incrementa la supervivencia de los bastones, así como si mejora la función visual de los ratones.

## 5.2 Papel de la autofagia en la muerte celular durante el desarrollo embrionario

### 5.2.1 Hay un déficit en el proceso de degradación de las células apoptóticas en las retinas deficientes de Atg5

En nuestros resultados, hemos visto que en el desarrollo de la retina de ratones a la edad de E13.5, los ratones deficientes en Atg5 presentan alteraciones en la eliminación de las células apoptóticas, ya que en retinas deficientes en Atg5 se observa un incremento en el número de células muertas, el número de compartimentos acídicos y el número de células microgliales (**Figura 4.68 del apartado de resultados**). Estos datos se podrían explicar por una falta de fagocitosis de estas células apoptóticas [243], que resultaría en esta acumulación de células TUNEL y que la microglía acudiera en función del daño, ya que, las células muertas apoptóticas se eliminan rápida y eficientemente a través de la fagocitosis ejecutada por microglia, el fagocito profesional del cerebro [288].

La microglia son los macrófagos cerebrales residentes y se han estudiado tradicionalmente como orquestadores de la respuesta inflamatoria cerebral durante infecciones y enfermedades [289]. Además, la microglia tiene un papel más benigno y menos explorado como fagocitos profesionales del cerebro [288], ya que engloban y degradan las células muertas, los microbios, los restos axonales y de mielina, los depósitos de proteína beta amiloide (A $\beta$ ) y sinapsis supernumerarias bajo diferentes condiciones. La fagocitosis es un mecanismo complejo que comprende tres fases diferentes: "encuéntrame", "cómeme" y "digiereme" (**Figura 5.7**). La microglia invade el tejido retiniano mucho antes de la ventana de muerte neuronal del desarrollo y tiene un doble papel neuroprotector y perjudicial en la retina inmadura y madura [172], [290].



**Figura 5.7. Modelo de tres pasos de la fagocitosis microglial.** En condiciones fisiológicas, los procesos microgliales son muy móviles y responden a las moléculas quimioatrayentes liberadas por las células dañadas o apoptóticas (señales de "encuétrame"), como la fractalquina y los nucleótidos extracelulares (ATP, UDP). A continuación, se forma una sinapsis de engrosamiento entre una serie de receptores microgliales y sus ligandos en la membrana de la célula apoptótica (señales de "cómeme"), lo que lleva a la inmovilización de la célula apoptótica en un fagosoma. El fagosoma madura al fusionarse con los lisosomas y otros orgánulos, y la célula apoptótica se degrada completamente en el fagolisosoma en menos de 2 horas [288].

Observamos que en las retinas wt, la microglía presenta una morfología ramificada, y que en las retinas deficientes en Atg5 es ameboide (**Figura 4.69 de resultados**). La microglía constituye la población innata de células inmunes del sistema nervioso central (SNC). Desde los primeros estudios de Río-Hortega, en general se ha aceptado que la microglía ramificada en el SNC se dispersa uniformemente en todo el SNC. Cada célula microglial ramificada explora continuamente el medio ambiente extendiéndose y retrayéndose, mostrando inhibición de contacto con otras células microgliales [290]. En el SNC patológico, la microglía ramificada adquiere un fenotipo activado (microglía activada) caracterizado por una morfología ameboidea tipo macrófago, con regulación positiva de las capacidades migratorias, proliferativas y fagocíticas, y la producción de moléculas neurotóxicas y / o neurotróficas [291]. Las señales que dan lugar a este fenotipo activo son, entre otras, especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico, y citoquinas proinflamatorias como son TNF $\alpha$  y IL1 $\beta$  [292].

Como se ha mencionado anteriormente, la fagocitosis es un mecanismo complejo que comprende tres fases diferentes: "encuétrame", "cómeme" y "digiéreme" (**Figura 5.7**). En la primera y segunda fase se expresan diferentes señales extracelulares que son recibidas por los diferentes receptores microgliales [293], como por ejemplo también, en la fase de "cómeme" la microglía reconoce sus dianas a través de ligandos específicos presentes en células apoptóticas como fosfatidilserina, integrinas, inmunoglobulinas (superfamilia de IgG) y proteínas del complemento [288], [294], [295]. La señal más descrita es la



exposición de fosfatidilserina por las células apoptóticas. Observamos que la exposición de esta serina era igual en retinas wt que en retinas deficientes de Atg5 (**Figura 4.68 del apartado de resultados**), y que además, el reconocimiento por la microglía de las células apoptóticas se estaba dando, a diferencia de lo que ocurría en la retina de pollo tras la inhibición farmacológica de la autofagia [243], ya que encontramos mayor número de cuerpos apoptóticos en el interior de las células microgliales en las retinas deficientes de autofagia.

Dentro de estas células microgliales se observaron acumulaciones de células TUNEL (**Figura 4.70 del apartado de resultados**), lo que podría indicar que bien la deficiencia de autofagia incrementa la fagocitosis o hay un bloqueo en la degradación. Para discernir entre estas dos posibilidades bloqueamos el proceso de fagocitosis con inhibidor del receptor de fosfatidilserina (P-L-Serina) (**Figura 4.71 del apartado de resultados**) comprobamos que efectivamente la ausencia de Atg5 provocaba una alteración en la degradación de las células apoptóticas, habiendo el mismo número de células apoptóticas con el inhibidor que en su ausencia. Estos resultados son parecidos a lo que ocurre en las células del epitelio pigmentario cuando son deficientes de autofagia [151].

Es sabido que la insulina es un factor de supervivencia durante el desarrollo de la retina embrionaria [244], cuando se cultivan retinas en su ausencia, se produce un gran aumento de muerte celular. En retinas que habían sido cultivadas en ausencia de insulina, no se observó la acumulación de TUNEL dentro de las células microgliales (**Figura 4.73 del apartado de resultados**), por lo que concluimos que estas células son capaces de procesar y degradar grandes cantidades de células apoptóticas, por lo que Atg5 es necesario para la degradación. Una manera adicional de comprobar esto sería realizar los cultivos de sin insulina en las retinas deficientes de autofagia y comprobar que todavía tienen un mayor número de cuerpos apoptóticos por célula microglial.

Esta conclusión también fue apoyada por los niveles bajos de ATP en las retinas deficientes en Atg5 con respecto al WT (**Figura 4.74 del apartado de resultados**), ya que los nutrientes obtenidos por la autofagia tienen un importante papel en la producción de ATP [245]. La degradación lisosomal genera componentes celulares como aminoácidos, ácidos grasos libres y carbohidratos que pueden ser reciclados para mantener las funciones energéticas y biosintéticas de la célula [246], [247]. El hecho de que haya niveles de ATP

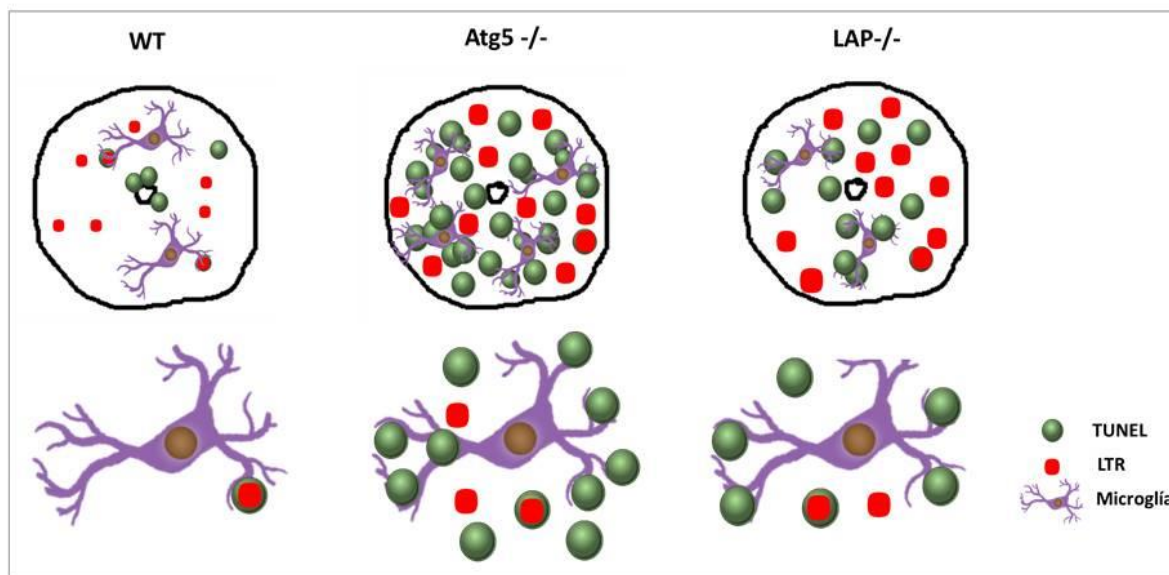
menores, puede ser otro indicativo de ausencia del proceso de degradación, sin embargo, en la retina de pollo E4 en desarrollo, el tratamiento con 3-MA (inhibidor de autofagia) redujo significativamente los niveles de ATP, lo que suponía una inhibición de la exposición de fosfatidilserina y LTR, ya que al restablecer los niveles de ATP con MP, análogo de piruvato permeable a las células que sirve como un sustrato alternativo para la generación mitocondrial de ATP, se redujeron el número de células TUNEL-positivas a números basales, y restableció la tinción de Anexina-V y LTR [243]. Este fenómeno no lo encontramos en las retinas deficientes de Atg5, ya que la exposición de PS es la misma que en retinas WT. Por otro lado, sabemos que la eliminación de los cuerpos apoptóticos tiene lugar en última instancia en los lisosomas. Lo que observamos, sin embargo, es un aumento de LTR en las retinas deficientes en Atg5 (**Figura 4.68 del apartado de resultados**), pero éstos, no se encuentran en el interior de las células microgliales coincidiendo con las células apoptóticas, por lo que no se está llevando a cabo la degradación (**Figura 4.75 del apartado de resultados**).

Por tanto, la fagocitosis por la microglía, así como la degradación en su interior es necesaria para la homeostasis de la retina. Es posible por otro lado, que también tengan un papel importante las células vecinas (neuroblastos y células ganglionares recién diferenciadas en estas edades), como se ha visto en la retina de pollo, que son las encargadas de la eliminación de cuerpos apoptóticos durante el desarrollo embrionario de la retina [243]. Es posible, que con una tinción de F-actina o marcadores más específicos, confirmemos si en la retina embrionaria de ratón, la microglía es la principal célula fagocítica o si también es esencial la fagocitosis por las células vecinas. Si no se eliminan las células apoptóticas, puede conllevar a la iniciación de una respuesta inflamatoria perjudicial, así como también una reducción del espacio físico que puede inhibir la neurogénesis.

### 5.2.2 La fagocitosis asociada a LC3 (LAP) es esencial para la degradación de las células apoptóticas durante el desarrollo de la retina de ratón

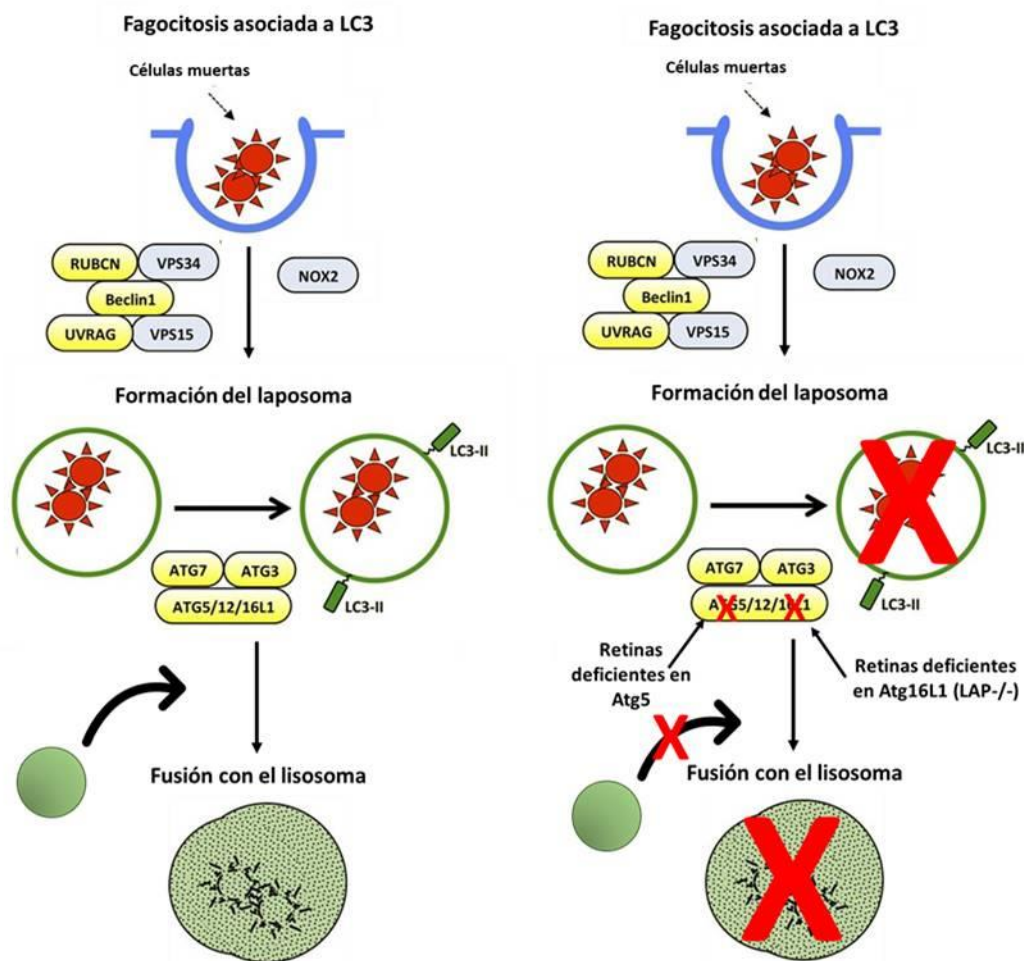
El fenotipo que encontramos en las retinas de los ratones deficientes en Atg5 fue similar al que encontramos en los ratones deficientes en la vía de fagocitosis asociada a LC3 (LAP) (**Figura 5.8**), los cuales tienen una mutación en el dominio de ATG16L1, el cual está implicado en el último paso de esta vía permitiendo llevar a cabo la lipidación de

LC3 en la membrana de los fagosomas, junto con ATG12–ATG5 [138]. Se observó un fenotipo más agresivo en las retinas deficientes en Atg5 que en las retinas LAP<sup>-/-</sup>, sin embargo, también encontramos en la microglía acumulaciones de células apoptóticas (**Figura 4.76 del apartado de resultados**) (**Figura 5.8**).



**Figura 5.8.** Las retinas deficientes en Atg5 y LAP presentan una acumulación de células TUNEL dentro de la microglía, ya que no se produce la fusión del autofagosoma con el lisosoma y por tanto hay un bloqueo en la degradación.

LAP está conectado con la eliminación de células apoptóticas por células fagocíticas, en un proceso conocido como eferocitosis. Los fagocitos profesionales, específicamente los macrófagos, eliminan de manera eficiente las células muertas para evitar la liberación de señales inflamatorias, y así mantener la homeostasis del tejido [140]–[142]. LAP media la inmunorregulación en respuesta a las células apoptóticas, y los ratones que son deficientes para LAP, pero no la autofagia canónica, acumulan cuerpos apoptóticos en sus tejidos y dentro del citosol de las células fagocíticas [296], hecho que nos hace pensar que tanto en las retinas deficientes en Atg5 como en Atg16L1, tienen un déficit en la vía LAP, y que esta es la vía principal de la degradación de las células apoptóticas (**Figura 5.9**).



**Figura 5.9.** La fagocitosis asociada a LC3 es esencial en la eliminación de las células apoptóticas durante el desarrollo embrionario. Atg5 y Atg16L1 son dos proteínas implicadas en la vía LAP que actúan en el mismo complejo y su deficiencia provoca la lippidación de LC3, y por lo tanto la fusión del autofagosoma con el lisosoma.

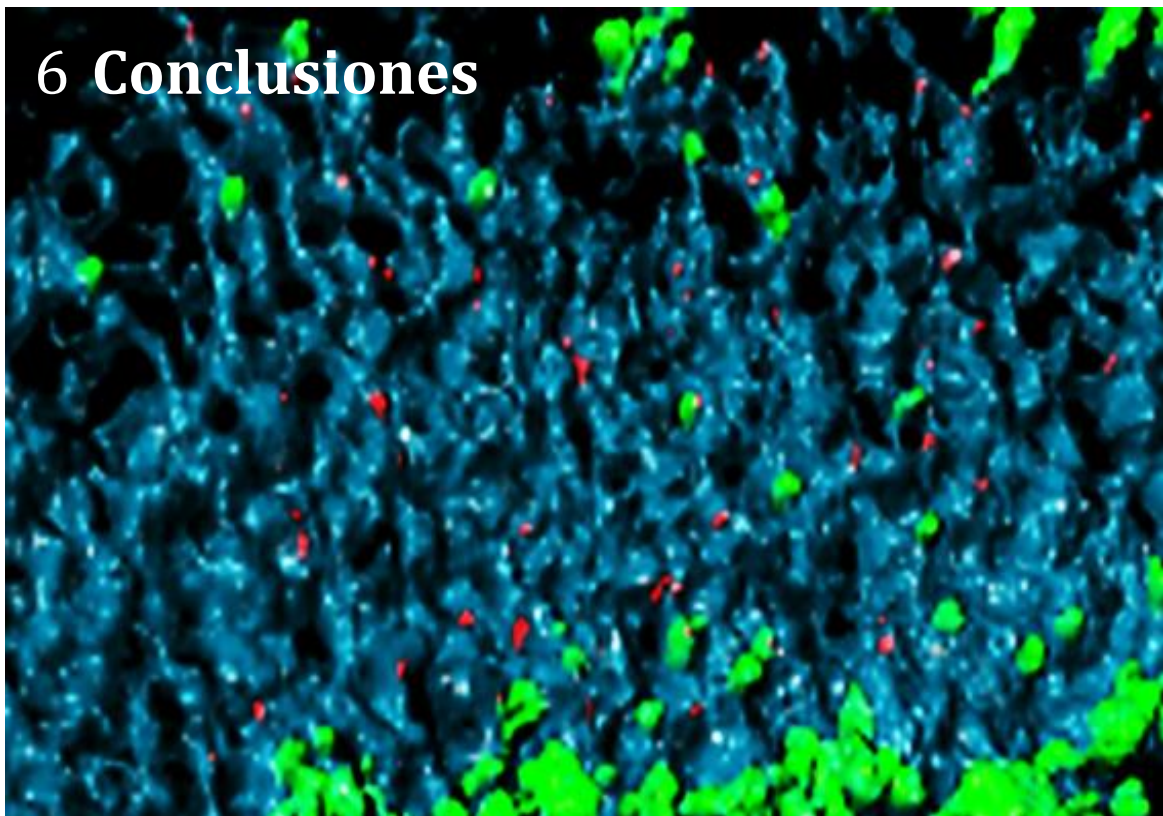
El hecho que el fenotipo de las retinas deficientes en Atg5 sea más agresivo, puede ser que se deba a que Atg5 también está implicado en la vía canónica de autofagia, y por tanto es posible que la formación de autofagosomas también esté alterada y contribuya al aumento del número de células apoptóticas. Hecho que puede aumentar las señales inflamatorias presentes en la retina a través de las cuales la microglía actuaría. Quizá en las retinas de los ratones LAP<sup>-/-</sup> estas señales sean menores y por lo tanto no aumente el número de célula microgliales.

Las alteraciones fisiológicas que hemos encontrado en las retinas adultas deficientes en LAP están relacionadas con atrofas en el RPE y desorganización tanto de los conos como de los bastones (**Figura 4.79 del apartado de resultados**). Se ha demostrado que en la fagocitosis de los segmentos externos por parte el RPE, tiene un papel esencial la

fagocitosis asociada a LC3, y que una alteración en este proceso puede afectar a la longevidad de los fotorreceptores, provocando, entre otras cosas, su atrofia [151]. La importancia de este proceso se verificó en ratones con las células RPE deficientes en Atg5 que mostraron evidencia de degradación de segmentos externos interrumpida, disminuyendo los niveles de cromóforo así como la función visual [151].

Estos resultados apoyan nuestra teoría de que LAP tiene una importante implicación en la retina, tanto en edad embrionaria como en edad adulta, y que tanto el modelo de Atg5KO como el modelo de Atg16L1 KO tienen una deficiencia en LAP, ya que ambas proteínas están implicadas en el mismo paso en la vía no canónica, en la lipidación de LC3. Por lo que concluimos, que la fagocitosis asociada a LC3 es esencial para la degradación de las células apoptóticas durante el desarrollo de la retina de ratón.

## 6 Conclusiones



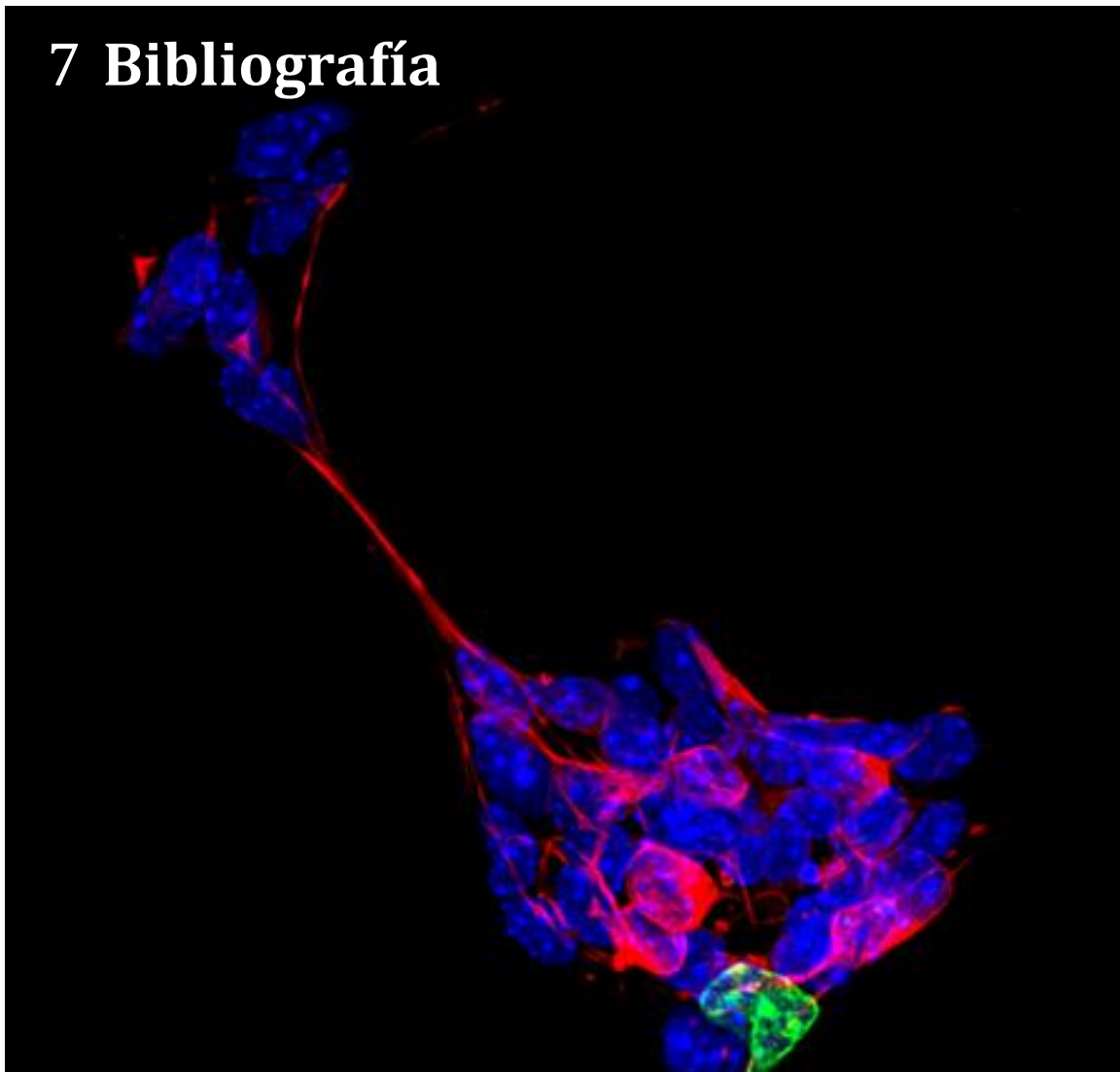




1. El MitoTracker Deep Red (MTDR) combinado con inhibidores de autofagia y mitofagia permite la determinación cuantitativa del flujo mitofágico por citometría de flujo. La inmunofluorescencia de DNA mitocondrial permite el estudio de la dinámica mitocondrial y su disminución refleja la degradación de las mitocondrias por autofagia. Los reporteros Mito-QC y GFP-mCherry-LC3 permiten determinar por análisis de imagen la mitofagia y macroautofagia de una manera cuantitativa *in vitro* e *in vivo*.
2. La autofagia es un proceso relevante en el ojo, tanto embrionario como adulto, donde la encontramos que está en todas las regiones estudiadas. La mitofagia no predomina en el ojo en desarrollo, sin embargo, en el ojo adulto toda la autofagia es mitofagia en la capa nuclear externa, epitelio pigmentario y nervio óptico.
3. Durante la mitofagia en la retina hay un transporte de los lisosomas y de los mitolisosomas desde el segmento interno a la capa nuclear externa, donde se produce su degradación. Este transporte es necesario para que se lleve a cabo la degradación completa de las mitocondrias en los somas y axones de los fotorreceptores.
4. El MNU es un buen modelo farmacológico que induce la muerte de fotorreceptores a un día de tratamiento en la zona central de la retina, afectando tanto a conos como bastones y activando la glía de Müller.
5. El MNU modula la mitofagia por la vía dependiente de PINK1/Parkin. Induce mitofagia a dosis bajas, y disminuye la mitofagia a dosis elevadas donde produce la alteración de diferentes orgánulos y alteraciones en pH lisosomal.
6. La mitofagia presenta un papel neuroprotector de los fotorreceptores ante el daño provocado por el MNU. La sobreexpresión de Parkin en líneas celulares y la inducción de mitofagia mediante DFP en retinas *ex vivo*, han mantenido la viabilidad celular así como la supervivencia de los conos.
7. La fagocitosis asociada a LC3 (LAP) es esencial para el mantenimiento homeostático y para la neurogénesis durante el desarrollo embrionario de la retina. Retinas deficientes de LAP muestran un bloqueo en la degradación de las células apoptóticas por parte de la microglía, viéndose disminuida la fusión entre autofagosomas y lisosomas.



## 7 Bibliografía





- [1] Z. Yang and D. J. Klionsky, “Eaten alive: A history of macroautophagy,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 12, no. 9, pp. 814–822, 2010.
- [2] P. Boya, F. Reggiori, and P. Codogno, “Emerging regulation and functions of autophagy,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 15, no. 7, pp. 713–720, Jul. 2013.
- [3] P. Boya, L. Esteban-Martínez, A. Serrano-Puebla, R. Gómez-Sintes, and B. Villarejo-Zori, “Autophagy in the eye: Development, degeneration, and aging,” *Prog. Retin. Eye Res.*, vol. 55, pp. 206–245, 2016.
- [4] S. Kaushik and A. M. Cuervo, “Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world,” *Trends Cell Biol.*, vol. 22, no. 8, pp. 407–417, Aug. 2012.
- [5] J. F. Dice, “Microinjected ribonuclease A as a probe for lysosomal pathways of intracellular protein degradation,” *J. Protein Chem.*, vol. 7, no. 2, pp. 115–127, Apr. 1988.
- [6] H. L. Chiang, S. R. Terlecky, C. P. Plant, and J. F. Dice, “A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins,” *Science* (80-.), vol. 246, no. 4928, pp. 382–385, 1989.
- [7] S. S. Wing, H. L. Chiang, A. L. Goldberg, and J. F. Dice, “Proteins containing peptide sequences related to Lys-Phe-Glu-Arg-Gln are selectively depleted in liver and heart, but not skeletal muscle, of fasted rats,” *Biochem. J.*, vol. 275, no. 1, pp. 165–169, 1991.
- [8] N. Salvador, C. Aguado, M. Horst, and E. Knecht, “Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 35, pp. 27447–56, Sep. 2000.
- [9] R. Sahu *et al.*, “Microautophagy of Cytosolic Proteins by Late Endosomes,” *Dev. Cell*, vol. 20, no. 1, pp. 131–139, 2011.
- [10] N. T. Ktistakis and S. A. Tooze, “Digesting the Expanding Mechanisms of Autophagy,” *Trends Cell Biol.*, vol. 26, no. 8, pp. 624–635, 2016.
- [11] C. F. Bento *et al.*, “Mammalian Autophagy: How Does It Work?,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 85, no. 1, pp. 685–713, 2016.
- [12] N. N. Noda and F. Inagaki, “Mechanisms of Autophagy,” *Annu. Rev. Biophys.*, vol. 44, no. 1, pp. 101–122, 2015.
- [13] A. Stolz, A. Ernst, and I. Dikic, “Cargo recognition and trafficking in selective autophagy,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 16, no. 6, pp. 495–501, 2014.
- [14] Á. B. Birgisdottir, T. Lamark, and T. Johansen, “The LIR motif - crucial for selective autophagy,” *J. Cell Sci.*, vol. 126, no. 15, pp. 3237–3247, 2013.
- [15] A. H. Chourasia, M. L. Boland, and K. F. Macleod, “Mitophagy and cancer,” *Cancer Metab.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–11, 2015.
- [16] Y. Wei, W.-C. Chiang, R. J. Sumpter, P. Mishra, and B. Levine, “Prohibitin 2 Is an



- Inner Mitochondrial Membrane Mitophagy Receptor.,” *Cell*, vol. 168, no. 1–2, p. 224–238.e10, Jan. 2017.
- [17] A. Khaminets, C. Behl, and I. Dikic, “Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy,” *Trends Cell Biol.*, vol. xx, pp. 1–11, 2015.
  - [18] H. Knaevelsrud, S. R. Carlsson, and A. Simonsen, “SNX18 tubulates recycling endosomes for autophagosome biogenesis,” *Autophagy*, vol. 9, no. 10, pp. 1639–1641, 2013.
  - [19] H. L. Olsvik *et al.*, “FYCO1 contains a C-terminally extended, LC3A/B-preferring LC3-interacting region (LIR) motif required for efficient maturation of autophagosomes during basal autophagy,” *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 49, pp. 29361–29374, 2015.
  - [20] P. M. Wong, C. Puente, I. G. Ganley, and X. Jiang, “The ULK1 complex sensing nutrient signals for autophagy activation,” *Autophagy*, vol. 9, no. 2, pp. 124–137, 2013.
  - [21] Y. Feng, Z. Yao, and D. J. Klionsky, “How to control self-digestion: transcriptional, post-transcriptional, and post-translational regulation of autophagy.,” *Trends Cell Biol.*, vol. 25, no. 6, pp. 354–363, Jun. 2015.
  - [22] M. Sardiello *et al.*, “A gene network regulating lysosomal biogenesis and function.,” *Science*, vol. 325, no. 5939, pp. 473–7, Jul. 2009.
  - [23] I. Tanida, T. Ueno, and E. Kominami, “LC3 conjugation system in mammalian autophagy,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 36, no. 12, pp. 2503–2518, 2004.
  - [24] N. Mizushima, A. Yamamoto, M. Matsui, T. Yoshimori, and Y. Ohsumi, “In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker.,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 15, no. 3, pp. 1101–1111, Mar. 2004.
  - [25] N. Mizushima and T. Yoshimori, “How to interpret LC3 immunoblotting,” *Autophagy*, vol. 3, no. 6, pp. 542–545, 2007.
  - [26] D. J. Klionsky *et al.*, “Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition),” *Autophagy*, vol. 12, no. 1, pp. 1–222, 2016.
  - [27] A. Orvedahl *et al.*, “Image-based genome-wide siRNA screen identifies selective autophagy factors.,” *Nature*, vol. 480, no. 7375, pp. 113–117, Dec. 2011.
  - [28] B. Levine, “Eating oneself and uninvited guests: Autophagy-related pathways in cellular defense,” *Cell*, vol. 120, no. 2, pp. 159–162, 2005.
  - [29] M. Komatsu and Y. Ichimura, “Selective autophagy regulates various cellular functions,” *Genes to Cells*, vol. 15, no. 9, pp. 923–933, 2010.
  - [30] R. Singh *et al.*, “Autophagy regulates lipid metabolism.,” *Nature*, vol. 458, no. 7242, pp. 1131–1135, Apr. 2009.
  - [31] A. R. Bellu and J. A. K. W. Kiel, “Selective degradation of peroxisomes in yeasts,”

- Microsc. Res. Tech.*, vol. 61, no. 2, pp. 161–170, 2003.
- [32] S. J. Goldman, R. Taylor, Y. Zhang, and S. Jin, “Autophagy and the degradation of mitochondria,” *Mitochondrion*, vol. 10, no. 4, pp. 309–315, Jun. 2010.
  - [33] I. Kim, S. Rodriguez-Enriquez, and J. J. Lemasters, “Selective degradation of mitochondria by mitophagy,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 462, no. 2, pp. 245–253, 2007.
  - [34] T. Yorimitsu and D. J. Klionsky, “Eating the endoplasmic reticulum: quality control by autophagy,” *Trends Cell Biol.*, vol. 17, no. 6, pp. 279–285, 2007.
  - [35] D. J. Metcalf, M. García-Arencibia, W. E. Hochfeld, and D. C. Rubinsztein, “Autophagy and misfolded proteins in neurodegeneration,” *Exp. Neurol.*, vol. 238, no. 1, pp. 22–28, 2012.
  - [36] E. Wong and A. M. Cuervo, “Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases,” *Nat. Neurosci.*, vol. 13, no. 7, pp. 805–811, 2010.
  - [37] L. Galluzzi *et al.*, “Molecular definitions of autophagy and related processes,” *EMBO J.*, vol. 36, no. 13, pp. 1811–1836, Jul. 2017.
  - [38] R. J. Youle and D. P. Narendra, “Mechanisms of mitophagy,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 12, no. 1, pp. 9–14, 2011.
  - [39] G. Ashrafi and T. L. Schwarz, “The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria,” *Cell Death Differ.*, vol. 20, no. 1, pp. 31–42, 2013.
  - [40] L. Esteban-Martínez *et al.*, “Programmed mitophagy is essential for the glycolytic switch during cell differentiation,” *EMBO J.*, vol. 36, no. 12, pp. 1688–1706, 2017.
  - [41] D. J. Klionsky *et al.*, “A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes,” *Dev. Cell*, vol. 5, no. 4, pp. 539–545, 2003.
  - [42] H. Nakatogawa, K. Suzuki, Y. Kamada, and Y. Ohsumi, “Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: Lessons from yeast,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 10, no. 7, pp. 458–467, 2009.
  - [43] M. Mehrpour, A. Esclatine, I. Beau, and P. Codogno, “Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells,” *Cell Res.*, vol. 20, no. 7, pp. 748–762, Jul. 2010.
  - [44] B. Ravikumar *et al.*, “Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology,” *Physiol. Rev.*, vol. 90, no. 4, pp. 1383–1435, 2010.
  - [45] S. Tsukamoto, A. Kuma, M. Murakami, C. Kishi, A. Yamamoto, and N. Mizushima, “Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos,” *Science*, vol. 321, no. 5885, pp. 117–20, Jul. 2008.
  - [46] P. Boya *et al.*, “Inhibition of Macroautophagy Triggers Apoptosis Inhibition of Macroautophagy Triggers Apoptosis †,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 25, no. 3, pp. 1025–1040, 2005.
  - [47] J. Nedjic, M. Aichinger, J. Emmerich, N. Mizushima, and L. Klein, “Autophagy in

- thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance,” *Nature*, vol. 455, no. 7211, pp. 396–400, 2008.
- [48] L. M. Stephenson *et al.*, “Identification of Atg5 -dependent transcriptional changes and increases in mitochondrial mass in Atg5 -deficient T lymphocytes,” no. July, pp. 625–635, 2009.
- [49] N. Mizushima and B. Levine, “Autophagy in mammalian development and differentiation,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 12, no. 9, pp. 823–30, Sep. 2010.
- [50] A. M. Cuervo, “Autophagy and aging: keeping that old broom working,” *Trends Genet.*, vol. 24, no. 12, pp. 604–612, 2008.
- [51] N. Rodriguez-Muela *et al.*, “Lysosomal membrane permeabilization and autophagy blockade contribute to photoreceptor cell death in a mouse model of retinitis pigmentosa,” *Cell Death Differ.*, vol. 22, no. 3, pp. 476–487, Mar. 2015.
- [52] A. Terman, B. Gustafsson, and U. T. Brunk, “Mitochondrial damage and intralysosomal degradation in cellular aging,” *Mol. Aspects Med.*, vol. 27, no. 5–6, pp. 471–482, 2006.
- [53] A. M. Cuervo, E. Bergamini, U. T. Brunk, W. Dröge, M. Ffrench, and A. Terman, “Autophagy and aging: the importance of maintaining ‘clean’ cells,” *Autophagy*, vol. 1, no. 3, pp. 131–140, 2005.
- [54] T. Eisenberg *et al.*, “Induction of autophagy by spermidine promotes longevity,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 11, no. 11, pp. 1305–1314, 2009.
- [55] E. Morselli *et al.*, “The life span-prolonging effect of sirtuin-1 is mediated by autophagy,” *Autophagy*, vol. 6, no. 1, pp. 186–188, 2010.
- [56] D. W. Lamming, L. Ye, D. M. Sabatini, and J. A. Baur, “Rapalogs and mTOR inhibitors as anti-aging therapeutics,” *J. Clin. Invest.*, vol. 123, no. 3, pp. 980–989, Mar. 2013.
- [57] S. Saha, D. P. Panigrahi, S. Patil, and S. K. Bhutia, “Autophagy in health and disease: A comprehensive review,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 104, no. April, pp. 485–495, 2018.
- [58] I. Dikic and Z. Elazar, “Mechanism and medical implications of mammalian autophagy,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 19, no. 6, pp. 349–364, 2018.
- [59] V. M. Aita *et al.*, “Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21,” *Genomics*, vol. 59, no. 1, pp. 59–65, 1999.
- [60] X. H. Liang *et al.*, “Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin1,” *Nature*, vol. 402, no. 9, pp. 672–676, Jun. 1999.
- [61] A. Takamura *et al.*, “Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors,” *Genes Dev.*, vol. 25, no. 8, pp. 795–800, 2011.
- [62] O. Mikhaylova *et al.*, “VHL-regulated MiR-204 suppresses tumor growth through inhibition of LC3B-mediated autophagy in renal clear cell carcinoma,” *Cancer Cell*,

- vol. 21, no. 4, pp. 532–546, Apr. 2012.
- [63] L. C. Gomes and I. Dikic, “Autophagy in antimicrobial immunity,” *Mol. Cell*, vol. 54, no. 2, pp. 224–233, 2014.
  - [64] T. Saitoh *et al.*, “Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 $\beta$  production,” *Nature*, vol. 456, no. 7219, pp. 264–268, 2008.
  - [65] C. Paludan *et al.*, “Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy,” *Science* (80-. ), vol. 307, no. 5709, pp. 593–596, 2005.
  - [66] M. Loi *et al.*, “Macroautophagy Proteins Control MHC Class I Levels on Dendritic Cells and Shape Anti-viral CD8(+) T Cell Responses.,” *Cell Rep.*, vol. 15, no. 5, pp. 1076–1087, May 2016.
  - [67] J. Wei *et al.*, “Autophagy enforces functional integrity of regulatory T cells by coupling environmental cues and metabolic homeostasis,” *Nat. Immunol.*, vol. 17, no. 3, pp. 277–285, Mar. 2016.
  - [68] B. Ravikumar, R. Duden, and D. C. Rubinsztein, “Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy.,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 11, no. 9, pp. 1107–1117, May 2002.
  - [69] J. L. Webb, B. Ravikumar, J. Atkins, J. N. Skepper, and D. C. Rubinsztein, “ $\alpha$ -synuclein Is Degraded by Both Autophagy and the Proteasome,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 27, pp. 25009–25013, 2003.
  - [70] Z. Berger *et al.*, “Rapamycin alleviates toxicity of different aggregate-prone proteins,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 15, no. 3, pp. 433–442, 2006.
  - [71] I. Lonskaya, M. L. Hebron, N. K. Algarzae, N. Desforjes, and C. E.-H. Moussa, “Decreased parkin solubility is associated with impairment of autophagy in the nigrostriatum of sporadic Parkinson’s disease.,” *Neuroscience*, vol. 232, pp. 90–105, Mar. 2013.
  - [72] A. M. Van Der Blik, M. M. Sedensky, and P. G. Morgan, “Cell biology of the mitochondrion,” *Genetics*, vol. 207, no. 3, pp. 843–871, 2017.
  - [73] N. M. Druzhyna, G. L. Wilson, and S. P. LeDoux, “Mitochondrial DNA repair in aging and disease.,” *Mech. Ageing Dev.*, vol. 129, no. 7–8, pp. 383–390, 2008.
  - [74] A. W. El-hattab and F. Scaglia, “Cell Calcium Mitochondrial cytopathies,” *Cell Calcium*, vol. 60, no. 3, pp. 199–206, 2016.
  - [75] J. C. St. John, “Mitochondrial DNA copy number and replication in reprogramming and differentiation,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 52, pp. 93–101, 2016.
  - [76] J. N. Meyer, T. C. Leuthner, and A. L. Luz, “Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity,” *Toxicology*, vol. 391, pp. 42–53, Nov. 2017.
  - [77] C. Thornton, A. Jones, S. Nair, A. Aabdien, C. Mallard, and H. Hagberg, “Mitochondrial dynamics, mitophagy and biogenesis in neonatal hypoxic-ischaemic brain injury.,” *FEBS Lett.*, vol. 592, no. 5, pp. 812–830, Mar. 2018.

- [78] J. H. Um and J. Yun, “Emerging role of mitophagy in human diseases and physiology,” *BMB Rep.*, vol. 50, no. 6, pp. 299–307, 2017.
- [79] J. J. Lemasters, “Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging,” *Rejuvenation Res.*, vol. 8, no. 1, pp. 3–5, 2005.
- [80] I. E. Clark *et al.*, “Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin,” *Nature*, vol. 441, no. 7097, pp. 1162–1166, 2006.
- [81] J. Park *et al.*, “Mitochondrial dysfunction in Drosophila PINK1 mutants is complemented by parkin,” *Nature*, vol. 441, no. 7097, pp. 1157–1161, 2006.
- [82] D. Narendra, A. Tanaka, D. F. Suen, and R. J. Youle, “Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy,” *J. Cell Biol.*, vol. 183, no. 5, pp. 795–803, 2008.
- [83] H. Lu, G. Li, L. Liu, L. Feng, X. Wang, and H. Jin, “Regulation and function of mitophagy in development and cancer,” *Autophagy*, vol. 9, no. 11, pp. 1720–1736, 2013.
- [84] A. Eiyama and K. Okamoto, “PINK1/Parkin-mediated mitophagy in mammalian cells,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 33, pp. 95–101, 2015.
- [85] L. Montava-Garriga and I. G. Ganley, “Outstanding Questions in Mitophagy: What We Do and Do Not Know,” *J. Mol. Biol.*, 2019.
- [86] S. Pickles, P. Vigié, and R. J. Youle, “Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance,” *Curr. Biol.*, vol. 28, no. 4, pp. R170–R185, 2018.
- [87] A. M. Pickrell and R. J. Youle, “The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson’s disease,” *Neuron*, vol. 85, no. 2, pp. 257–273, Jan. 2015.
- [88] K. Shiba-Fukushima *et al.*, “PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy,” *Sci. Rep.*, vol. 2, pp. 1–8, 2012.
- [89] K. Yamano, N. Matsuda, and K. Tanaka, “The ubiquitin signal and autophagy: an orchestrated dance leading to mitochondrial degradation,” *EMBO Rep.*, vol. 17, no. 3, pp. 300–316, 2016.
- [90] M. Lazarou *et al.*, “The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy,” *Nature*, vol. 524, no. 7565, pp. 309–314, Aug. 2015.
- [91] J.-M. Heo, A. Ordureau, J. A. Paulo, J. Rinehart, and J. W. Harper, “The PINK1-PARKIN Mitochondrial Ubiquitylation Pathway Drives a Program of OPTN/NDP52 Recruitment and TBK1 Activation to Promote Mitophagy,” *Mol. Cell*, vol. 60, no. 1, pp. 7–20, Oct. 2015.
- [92] G. Chinnadurai, S. Vijayalingam, and S. B. Gibson, “BNIP3 subfamily BH3-only proteins: mitochondrial stress sensors in normal and pathological functions,” *Oncogene*, vol. 27, no. S1, pp. S114–S127, Dec. 2008.

- [93] R. Ray *et al.*, “BNIP3 heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-X(L) and induces cell death independent of a Bcl-2 homology 3 (BH3) domain at both mitochondrial and nonmitochondrial sites,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 2, pp. 1439–1448, 2000.
- [94] T. Imazu *et al.*, “Bcl-2/E1B 19 kDa-interacting protein 3-like protein (Bnip3L) interacts with Bcl-2/Bcl-x(L) and induces apoptosis by altering mitochondrial membrane permeability,” *Oncogene*, vol. 18, no. 32, pp. 4523–4529, 1999.
- [95] S. Daido, T. Kanzawa, A. Yamamoto, H. Takeuchi, Y. Kondo, and S. Kondo, “Pivotal role of the cell death factor BNIP3 in ceramide-induced autophagic cell death in malignant glioma cells,” *Cancer Res.*, vol. 64, no. 12, pp. 4286–4293, 2004.
- [96] A. Hamacher-Brady *et al.*, “Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves Bnip3 and autophagy,” *Cell Death Differ.*, vol. 14, no. 1, pp. 146–157, 2007.
- [97] R. L. Schweers *et al.*, “NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 49, pp. 19500–19505, 2007.
- [98] H. Sandoval *et al.*, “Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells,” *Nature*, vol. 454, no. 7201, pp. 232–235, Jul. 2008.
- [99] A. Hamacher-Brady and N. R. Brady, “Mitophagy programs: mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 73, no. 4, pp. 775–795, Feb. 2016.
- [100] S. Michiorri *et al.*, “The Parkinson-associated protein PINK1 interacts with Beclin1 and promotes autophagy,” *Cell Death Differ.*, vol. 17, no. 6, pp. 962–974, Jun. 2010.
- [101] C. Van Humbeeck *et al.*, “Parkin interacts with Ambra1 to induce mitophagy,” *J. Neurosci.*, vol. 31, no. 28, pp. 10249–10261, Jul. 2011.
- [102] W. X. Ding *et al.*, “Nix is critical to two distinct phases of mitophagy, reactive oxygen species-mediated autophagy induction and Parkin-ubiquitin-p62-mediated mitochondrial priming,” *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 36, pp. 27879–27890, 2010.
- [103] F. Gao, D. Chen, J. Si, Q. Hu, and Z. Qin, “The mitochondrial protein BNIP3L is the substrate of PARK2 and mediates mitophagy in PINK1 / PARK2 pathway Research and Therapy for Neuro-Psycho-Diseases and College of Pharmaceutical Sciences , Soochow University , Suzhou , Jiangsu 215021 , China,” *Hum Mol Genet*, 2015.
- [104] B. Koentjoro, J. Park, and C. M. Sue, “Nix restores mitophagy and mitochondrial function to protect against PINK1 / Parkin-related Parkinson ’ s disease,” *Nat. Publ. Gr.*, no. March, pp. 1–11, 2017.
- [105] M. Cha, D. K. Kim, and I. Mook-jung, “The role of mitochondrial DNA mutation on neurodegenerative diseases,” *Exp. & Mol. Med.*, vol. 47, no. 3, pp. e150-8, 2015.
- [106] J. Nah, J. Yuan, and Y. K. Jung, “Autophagy in neurodegenerative diseases: From mechanism to therapeutic approach,” *Mol. Cells*, vol. 38, no. 5, pp. 381–389, 2015.



- [107] E. M. Valente *et al.*, “Hereditary early-onset Parkinson’s disease caused by mutations in PINK1,” *Science* (80-. ), vol. 304, no. 5674, pp. 1158–1160, 2004.
- [108] T. Kitada *et al.*, “Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism,” *Nature*, vol. 392, no. 6676, pp. 605–608, 1998.
- [109] D. A. Sliter *et al.*, “Parkin and PINK1 mitigate STING-induced inflammation,” *Nature*, vol. 561, no. 7722, pp. 258–262, Sep. 2018.
- [110] G. Poulogiannis *et al.*, “PARK2 deletions occur frequently in sporadic colorectal cancer and accelerate adenoma development in Apc mutant mice,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 34, pp. 15145–15150, 2010.
- [111] F. Billia, L. Hauck, F. Konecny, V. Rao, J. Shen, and T. W. Mak, “PTEN-inducible kinase 1 (PINK1)/Park6 is indispensable for normal heart function,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 23, pp. 9572–9577, 2011.
- [112] A. H. V Schapira, “Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson ’ s disease,” 2008.
- [113] A. C. Poole, R. E. Thomas, L. A. Andrews, H. M. McBride, A. J. Whitworth, and L. J. Pallanck, “The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 5, pp. 1638–1643, Feb. 2008.
- [114] A. Berthier *et al.*, “PINK1 displays tissue-specific subcellular location and regulates apoptosis and cell growth in breast cancer cells,” *Hum. Pathol.*, vol. 42, no. 1, pp. 75–87, 2011.
- [115] L. Brennan, J. Khoury, and M. Kantorow, “Parkin elimination of mitochondria is important for maintenance of lens epithelial cell ROS levels and survival upon oxidative stress exposure,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1863, no. 1, pp. 21–32, Jan. 2017.
- [116] S. K. Barodia, R. B. Creed, and M. S. Goldberg, “Parkin and PINK1 functions in oxidative stress and neurodegeneration,” *Brain Res. Bull.*, vol. 133, no. 8, pp. 51–59, Jul. 2017.
- [117] D. W. Hailey *et al.*, “Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation,” *Cell*, vol. 141, no. 4, pp. 656–667, May 2010.
- [118] M. Hamasaki *et al.*, “Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites,” *Nature*, vol. 495, no. 7441, pp. 389–393, 2013.
- [119] H. Katayama, T. Kogure, N. Mizushima, T. Yoshimori, and A. Miyawaki, “A sensitive and quantitative technique for detecting autophagic events based on lysosomal delivery,” *Chem. Biol.*, vol. 18, no. 8, pp. 1042–1052, 2011.
- [120] B. Bingol *et al.*, “The mitochondrial deubiquitinase USP30 opposes parkin-mediated mitophagy,” *Nature*, vol. 510, no. 7505, pp. 370–375, 2014.
- [121] N. Sun *et al.*, “Measuring In Vivo Mitophagy,” *Mol. Cell*, vol. 60, no. 4, pp. 685–696, Nov. 2015.

- [122] G. F. G. Allen, R. Toth, J. James, and I. G. Ganley, “Loss of iron triggers PINK1/Parkin-independent mitophagy,” *EMBO Rep.*, vol. 14, no. 12, pp. 1127–1135, 2013.
- [123] T. G. McWilliams *et al.*, “Mito-QC illuminates mitophagy and mitochondrial architecture in vivo,” *J. Cell Biol.*, vol. 214, no. 3, pp. 333–345, 2016.
- [124] P. Codogno, M. Mehrpour, and T. Proikas-Cezanne, “Canonical and non-canonical autophagy: Variations on a common theme of self-eating?,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 13, no. 1, pp. 7–12, 2012.
- [125] M. A. Sanjuan, S. Milasta, and D. R. Green, “Toll-like receptor signaling in the lysosomal pathways,” *Immunol. Rev.*, vol. 227, no. 1, pp. 203–220, 2009.
- [126] M. A. Sanjuan *et al.*, “Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis,” *Nature*, vol. 450, no. 7173, pp. 1253–1257, 2007.
- [127] N. Mizushima *et al.*, “A protein conjugation system essential for autophagy,” *Nature*, vol. 395, no. 6700, pp. 395–398, 1998.
- [128] O. Florey and M. Overholtzer, “Autophagy proteins in macroendocytic engulfment,” *Trends Cell Biol.*, vol. 22, no. 7, pp. 374–380, Jul. 2012.
- [129] O. Florey, S. E. Kim, C. P. Sandoval, C. M. Haynes, and M. Overholtzer, “Autophagy machinery mediates macroendocytic processing and entotic cell death by targeting single membranes,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 13, no. 11, pp. 1335–1343, Nov. 2011.
- [130] J. Martinez *et al.*, “Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (LC3)-associated phagocytosis is required for the efficient clearance of dead cells,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 42, pp. 17396–17401, 2011.
- [131] J. Martinez *et al.*, “Molecular characterization of LC3-associated phagocytosis reveals distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 17, no. 7, pp. 893–906, Jul. 2015.
- [132] K. Segawa and S. Nagata, “An Apoptotic ‘Eat Me’ Signal: Phosphatidylserine Exposure,” *Trends Cell Biol.*, vol. 25, no. 11, pp. 639–650, 2015.
- [133] J. M. Backer, “The intricate regulation and complex functions of the Class III phosphoinositide 3-kinase Vps34,” *Biochem. J.*, vol. 473, no. 15, pp. 2251–2271, 2016.
- [134] K. Bedard and K. H. Krause, “The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology,” *Physiol. Rev.*, vol. 87, no. 1, pp. 245–313, 2007.
- [135] J. D. Lambeth and A. S. Neish, “Nox Enzymes and New Thinking on Reactive Oxygen: A Double-Edged Sword Revisited,” *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, vol. 9, no. 1, pp. 119–145, 2014.
- [136] G. Y. Lam, M. Cemma, A. M. Muise, D. E. Higgins, and J. H. Brumell, “Host and

- bacterial factors that regulate LC3 recruitment to *Listeria monocytogenes* during the early stages of macrophage infection,” *Autophagy*, vol. 9, no. 7, pp. 985–995, 2013.
- [137] J. Huang *et al.*, “Activation of antibacterial autophagy by NADPH oxidases,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 15, pp. 6226–6231, 2009.
  - [138] T. Hanada *et al.*, “The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy,” *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 52, pp. 37298–37302, 2007.
  - [139] J. Martinez, “LAP it up, fuzz ball: a short history of LC3-associated phagocytosis,” *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 55, pp. 54–61, 2018.
  - [140] C. J. Martin, K. N. Peters, and S. M. Behar, “Macrophages Clean Up: Efferocytosis and Microbial Control The Many Jobs of the Macrophage,” *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 0, pp. 17–23, 2014.
  - [141] L. Mukundan *et al.*, “PPAR- $\delta$  senses and orchestrates clearance of apoptotic cells to promote tolerance,” *Nat. Med.*, vol. 15, no. 11, pp. 1266–1272, Nov. 2009.
  - [142] Y. Q. Xiao, C. G. Freire-de-Lima, W. P. Schiemann, D. L. Bratton, R. W. Vandivier, and P. M. Henson, “Transcriptional and translational regulation of TGF- $\beta$  production in response to apoptotic cells,” *J. Immunol.*, vol. 181, no. 5, pp. 3575–3585, Sep. 2008.
  - [143] J. Martinez *et al.*, “Noncanonical autophagy inhibits the autoinflammatory, lupus-like response to dying cells,” *Nature*, vol. 533, no. 7601, pp. 115–119, May 2016.
  - [144] A. K. Simon and A. J. Clarke, “Non-canonical autophagy LAPs lupus,” *Cell death and differentiation*, vol. 23, no. 8. England, pp. 1267–1268, Aug-2016.
  - [145] R. A. Linsenmeier and L. Padnick-Silver, “Metabolic dependence of photoreceptors on the choroid in the normal and detached retina,” *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 41, no. 10, pp. 3117–3123, 2000.
  - [146] B. M. Kevany and K. Palczewski, “Phagocytosis of retinal rod and cone photoreceptors,” *Physiology*, vol. 25, no. 1, pp. 8–15, 2010.
  - [147] O. Strauss, “The retinal pigment epithelium in visual function,” *Physiol. Rev.*, vol. 85, no. 3, pp. 845–881, 2005.
  - [148] L. S. Frost *et al.*, “The Contribution of Melanoregulin to Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3 (LC3) Associated Phagocytosis in Retinal Pigment Epithelium,” *Mol. Neurobiol.*, vol. 52, no. 3, pp. 1135–1151, 2015.
  - [149] J. Yao *et al.*, “Deletion of autophagy inducer RB1CC1 results in degeneration of the retinal pigment epithelium,” *Autophagy*, 2015.
  - [150] L. Muniz-Feliciano, T. A. Doggett, Z. Zhou, and T. A. Ferguson, “RUBCN/rubicon and EGFR regulate lysosomal degradative processes in the retinal pigment epithelium (RPE) of the eye,” *Autophagy*, vol. 13, no. 12, pp. 2072–2085, 2017.
  - [151] J. Kim *et al.*, “Noncanonical Autophagy Promotes the Visual Cycle,” *Cell*, vol. 154, no. 2, pp. 365–376, Jul. 2013.

- [152] C.-S. Yang *et al.*, “The Autophagy Regulator Rubicon Is a Feedback Inhibitor of CARD9-Mediated Host Innate Immunity,” *Cell Host Microbe*, vol. 11, no. 3, pp. 277–289, Mar. 2012.
- [153] B. W. Jones, M. Kondo, H. Terasaki, Y. Lin, M. McCall, and R. E. Marc, “Retinal remodeling,” *Jpn. J. Ophthalmol.*, vol. 56, no. 4, pp. 289–306, Jul. 2012.
- [154] R. L. Chow and R. A. Lang, “Early eye development in vertebrates,” *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 17, pp. 255–96, 2001.
- [155] H. T. Kim and J. W. Kim, “Compartmentalization of vertebrate optic neuroepithelium: External cues and transcription factors,” *Mol. Cells*, vol. 33, no. 4, pp. 317–324, 2012.
- [156] J. L. R. Rubenstein and L. Puelles, “Homeobox Gene Expression during Development of the Vertebrate Brain,” *Curr. Top. Dev. Biol.*, vol. 29, no. C, pp. 1–8, 1994.
- [157] J. L. Zagozewski, Q. Zhang, and D. D. Eisenstat, “Genetic regulation of vertebrate eye development,” *Clin. Genet.*, vol. 86, no. 5, pp. 453–460, 2014.
- [158] E. Vecino and A. Acera, “Development and programmed cell death in the mammalian eye,” *Int. J. Dev. Biol.*, vol. 59, no. 1–3, pp. 63–71, 2015.
- [159] C. L. Cepko, C. P. Austin, X. Yang, M. Alexiades, and D. Ezzeddine, “Cell fate determination in the vertebrate retina,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, no. 2, pp. 589–595, Jan. 1996.
- [160] F. J. Livesey, C. L. Cepko, and H. H. Medical, “Livesey 與 Cepko - 2001 - Vertebrate neural cell-fate determination Lessons.pdf,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 2, no. February, pp. 109–118, 2001.
- [161] T. Marquardt and P. Gruss, “Generating neuronal diversity in the retina: One for nearly all,” *Trends Neurosci.*, vol. 25, no. 1, pp. 32–38, 2002.
- [162] R. H. Masland, “The fundamental plan of the retina,” *Nat. Neurosci.*, vol. 4, no. 9, pp. 877–86, Sep. 2001.
- [163] P. M. Henson and D. A. Hume, “Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis,” *Trends Immunol.*, vol. 27, no. 5, pp. 244–250, May 2006.
- [164] V. A. Fadok, D. R. Voelker, P. A. Campbell, J. J. Cohen, D. L. Bratton, and P. M. Henson, “Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages,” *J. Immunol.*, vol. 148, no. 7, pp. 2207–16, 1992.
- [165] V. Venegas and Z. Zhou, “Two alternative mechanisms that regulate the presentation of apoptotic cell engulfment signal in *Caenorhabditis elegans*,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 18, no. 8, pp. 3180–3192, Aug. 2007.
- [166] P. Boya and E. J. de la Rosa, “Cell death in early neural life,” *Birth Defects Res. C. Embryo Today*, vol. 75, no. 4, pp. 281–293, Dec. 2005.

- [167] A. I. Valenciano, P. Boya, and E. J. De La Rosa, “Early neural cell death: Numbers and cues from the developing neuroretina,” *Int. J. Dev. Biol.*, vol. 53, no. 8–10, pp. 1515–1528, 2009.
- [168] J. Morcillo, J. R. Martínez-Morales, F. Trousse, Y. Fermin, J. C. Sowden, and P. Bovolenta, “Proper patterning of the optic fissure requires the sequential activity of BMP7 and SHH,” *Development*, vol. 133, no. 16, pp. 3179–3190, 2006.
- [169] M. O. Péquignot *et al.*, “Major role of BAX in apoptosis during retinal development and in establishment of a functional postnatal retina,” *Dev. Dyn.*, vol. 228, no. 2, pp. 231–238, 2003.
- [170] S. Cohen-Cory and B. Lom, “Neurotrophic regulation of retinal ganglion cell synaptic connectivity: From axons and dendrites to synapses,” *Int. J. Dev. Biol.*, vol. 48, no. 8–9, pp. 947–956, 2004.
- [171] K. Kierdorf and M. Prinz, “Microglia in steady state,” *J. Clin. Invest.*, vol. 127, no. 9, pp. 3201–3209, 2017.
- [172] J. E. Lee, K. J. Liang, R. N. Fariss, and W. T. Wong, “Ex Vivo Dynamic Imaging of Retinal Microglia Using Time-Lapse Confocal Microscopy,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 49, no. 9, pp. 4169–4176, May 2008.
- [173] F. Ginhoux and M. Prinz, “Origin of microglia: Current concepts and past controversies,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 7, no. 8, pp. 1–15, 2015.
- [174] J. Navascués, A. Moujahid, A. Almendros, J. L. Marin-Teva, and M. A. Cuadros, “Origin of microglia in the quail retina: Central-to-peripheral and vitreal-to-scleral migration of microglial precursors during development,” *J. Comp. Neurol.*, vol. 354, no. 2, pp. 209–228, 1995.
- [175] M. A. Cuadros and J. Navascués, “The origin and differentiation of microglial cells during development,” *Prog. Neurobiol.*, vol. 56, no. 2, pp. 173–189, 1998.
- [176] E. A. Ling, C. Kaur, and W. C. Wong, “Expression of major histocompatibility complex and leukocyte common antigens in amoeboid microglia in postnatal rats,” *J. Anat.*, vol. 177, pp. 117–126, 1991.
- [177] M. Dihn  , F. Block, H. Korr, and R. T  pper, “Time course of glial proliferation and glial apoptosis following excitotoxic CNS injury,” *Brain Res.*, vol. 902, no. 2, pp. 178–189, 2001.
- [178] A. M. Santos *et al.*, “Embryonic and postnatal development of microglial cells in the mouse retina,” *J. Comp. Neurol.*, vol. 506, no. 2, pp. 224–39, Jan. 2008.
- [179] J. L. Marín-Teva, M. A. Cuadros, R. Calvente, A. Almendros, and J. Navascués, “Naturally occurring cell death and migration of microglial precursors in the quail retina during normal development,” *J. Comp. Neurol.*, vol. 412, no. 2, pp. 255–275, 1999.
- [180] A. R.   lvaro *et al.*, “NPY in rat retina is present in neurons, in endothelial cells and also in microglial and Müller cells,” *Neurochem. Int.*, vol. 50, no. 5, pp. 757–763, 2007.

- [181] T. Harada *et al.*, “Microglia-Müller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration,” *J. Neurosci.*, vol. 22, no. 21, pp. 9228–9236, 2002.
- [182] L. Centanin and J. Wittbrodt, “Retinal neurogenesis,” *Dev.*, vol. 141, no. 2, pp. 241–244, 2014.
- [183] A. N. Bramall, A. F. Wright, S. G. Jacobson, and R. R. McInnes, “The Genomic, Biochemical, and Cellular Responses of the Retina in Inherited Photoreceptor Degenerations and Prospects for the Treatment of These Disorders,” *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 33, no. 1, pp. 441–472, 2010.
- [184] M. N. Delyfer, T. Léveillard, S. Mohand-Saïd, D. Hicks, S. Picaud, and J. A. Sahel, “Inherited retinal degenerations: Therapeutic prospects,” *Biol. Cell*, vol. 96, no. 4, pp. 261–269, 2004.
- [185] R. W. Young, “Cell death during differentiation of the retina in the mouse,” *J. Comp. Neurol.*, vol. 229, no. 3, pp. 362–373, 1984.
- [186] G. Q. Chang, Y. Hao, and F. Wong, “Apoptosis: Final common pathway of photoreceptor death in rd, rds, and mutant mice,” *Neuron*, vol. 11, no. 4, pp. 595–605, 1993.
- [187] F. Paquet-Durand, S. Azadi, S. M. Hauck, M. Ueffing, T. Van Veen, and P. Ekström, “Calpain is activated in degenerating photoreceptors in the rd1 mouse,” *J. Neurochem.*, vol. 96, no. 3, pp. 802–814, 2006.
- [188] A. I. Arroba, N. Álvarez-Lindo, N. van Rooijen, and E. J. de la Rosa, “Microglia-mediated IGF-I neuroprotection in the rd10 mouse model of retinitis pigmentosa,” *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 52, no. 12, pp. 9124–9130, 2011.
- [189] D. Guerini, L. Coletto, and E. Carafoli, “Exporting calcium from cells,” *Cell Calcium*, vol. 38, no. 3–4 SPEC. ISS., pp. 281–289, 2005.
- [190] R. R. Fiscus, “Involvement of cyclic GMP and protein kinase G in the regulation of apoptosis and survival in neural cells,” *NeuroSignals*, vol. 11, no. 4, pp. 175–190, 2002.
- [191] L. Araújo Couto, M. S. Narciso, J. N. Hokoç, and A. M. B. Martinez, “Calpain inhibitor 2 prevents axonal degeneration of opossum optic nerve fibers,” *J. Neurosci. Res.*, vol. 77, no. 3, pp. 410–419, 2004.
- [192] S. M. Azarian, A. J. King, M. A. Hallett, and D. S. Williams, “Selective proteolysis of arrestin by calpain: Molecular characteristics and its effect on rhodopsin dephosphorylation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 41, pp. 24375–24384, 1995.
- [193] S. Ahuja *et al.*, “Rd1 mouse retina shows an imbalance in the activity of cysteine protease cathepsins and their endogenous inhibitor cystatin,” *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 49, no. 3, pp. 1089–1096, 2008.
- [194] H. F. Mendes, J. Van Der Spuy, J. P. Chapple, and M. E. Cheetham, “Mechanisms of cell death in rhodopsin retinitis pigmentosa: Implications for therapy,” *Trends Mol. Med.*, vol. 11, no. 4, pp. 177–185, 2005.



- [195] G. H. Travis, "Mechanisms of cell death in the inherited retinal degenerations," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 62, no. 3, pp. 503–508, 1998.
- [196] L. Dvir, G. Srour, R. Abu-Ras, B. Miller, S. A. Shalev, and T. Ben-Yosef, "Autosomal-recessive early-onset retinitis pigmentosa caused by a mutation in PDE6G, the gene encoding the gamma subunit of rod cGMP phosphodiesterase," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 87, no. 2, pp. 258–264, 2010.
- [197] B. Chang, N. L. Hawes, R. E. Hurd, M. T. Davisson, S. Nusinowitz, and J. R. Heckenlively, "Retinal degeneration mutants in the mouse.," *Vision Res.*, vol. 42, no. 4, pp. 517–525, Feb. 2002.
- [198] J. Han, A. Dinculescu, X. Dai, W. Du, W. C. Smith, and J. Pang, "Review: the history and role of naturally occurring mouse models with Pde6b mutations.," *Mol. Vis.*, vol. 19, pp. 2579–2589, Dec. 2013.
- [199] M. J. Phillips, D. C. Otteson, and D. M. Sherry, "Progression of neuronal and synaptic remodeling in the rd10 mouse model of retinitis pigmentosa.," *J. Comp. Neurol.*, vol. 518, no. 11, pp. 2071–2089, Jun. 2010.
- [200] Y. Emoto, K. Yoshizawa, and Y. Kinoshita, "Green tea. extract attenuates MNU-induced photoreceptor cell apoptosis via suppression of heme oxygenase-1," *J. Toxicol. Pathol.*, vol. 29, no. 1, pp. 61–65, 2016.
- [201] K. Tsuruma, M. Yamauchi, Y. Inokuchi, S. Sugitani, M. Shimazawa, and H. Hara, "Role of Oxidative Stress in Retinal Photoreceptor Cell Death in N-Methyl-N-nitrosourea-Treated Mice," *J. Pharmacol. Sci.*, vol. 118, no. 3, pp. 351–362, 2012.
- [202] Y. yuan Chen, S. liang Liu, D. ping Hu, Y. qiao Xing, and Y. Shen, "N -methyl- N -nitrosourea-induced retinal degeneration in mice," *Exp. Eye Res.*, vol. 121, pp. 102–113, 2014.
- [203] Y. Koriyama, S. Hisano, K. Ogai, K. Sugitani, A. Furukawa, and S. Kato, "Involvement of neuronal nitric oxide synthase in N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in mice," *J. Pharmacol. Sci.*, vol. 127, no. 3, pp. 394–396, 2015.
- [204] Y. Tao *et al.*, "The temporal topography of the N-Methyl- N-nitrosourea induced photoreceptor degeneration in mouse retina," *Sci. Rep.*, vol. 5, no. August, pp. 1–14, 2015.
- [205] J. Stone, D. van Driel, K. Valter, S. Rees, and J. Provis, "The locations of mitochondria in mammalian photoreceptors: relation to retinal vasculature.," *Brain Res.*, vol. 1189, pp. 58–69, Jan. 2008.
- [206] P. Yu-Wai-Man, P. G. Griffiths, and P. F. Chinnery, "Mitochondrial optic neuropathies - Disease mechanisms and therapeutic strategies," *Prog. Retin. Eye Res.*, vol. 30, no. 2, pp. 81–114, 2011.
- [207] C. Punzo, W. Xiong, and C. L. Cepko, "Loss of daylight vision in retinal degeneration: Are oxidative stress and metabolic dysregulation to blame?," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 3, pp. 1642–1648, 2012.
- [208] O. S. Sizova, V. M. Shinde, A. R. Lenox, and M. S. Gorbatyuk, "Modulation of

- cellular signaling pathways in P23H rhodopsin photoreceptors.,” *Cell. Signal.*, vol. 26, no. 4, pp. 665–672, Apr. 2014.
- [209] S. Oka, M. Ohno, D. Tsuchimoto, K. Sakumi, M. Furuichi, and Y. Nakabeppu, “Two distinct pathways of cell death triggered by oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNAs,” *EMBO J.*, vol. 27, no. 2, pp. 421–432, 2008.
- [210] J. H. Kam and G. Jeffery, “To unite or divide: Mitochondrial dynamics in the murine outer retina that preceded age related photoreceptor loss,” *Oncotarget*, vol. 6, no. 29, pp. 26690–26701, 2015.
- [211] J. Yao *et al.*, “Circadian and noncircadian modulation of autophagy in photoreceptors and retinal pigment epithelium,” *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 55, no. 5, pp. 3237–3246, 2014.
- [212] A. Kuma *et al.*, “The role of autophagy during the early neonatal starvation period,” *Nature*, vol. 432, no. 7020, pp. 1032–1036, 2004.
- [213] T. G. McWilliams *et al.*, “Basal Mitophagy Occurs Independently of PINK1 in Mouse Tissues of High Metabolic Demand,” *Cell Metab.*, vol. 27, no. 2, p. 439–449.e5, 2018.
- [214] S. Rai *et al.*, “The ATG5-binding and coiled coil domains of ATG16L1 maintain autophagy and tissue homeostasis in mice independently of the WD domain required for LC3-associated phagocytosis.,” *Autophagy*, vol. 15, no. 4, pp. 599–612, Apr. 2019.
- [215] S. A. Miller, D. D. Dykes, and H. F. Polesky, “A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 16, no. 3, p. 1215, 1988.
- [216] J. Aerts, J. Nys, and L. Arckens, “A highly reproducible and straightforward method to perform in vivo ocular enucleation in the mouse after eye opening,” *J. Vis. Exp.*, no. 92, pp. 1–5, 2014.
- [217] R. S. Carreira, Y. Lee, M. Ghochani, Å. B. Gustafsson, and R. A. Gottlieb, “Cyclophilin D is required for mitochondrial removal by autophagy in cardiac cells.,” *Autophagy*, vol. 6, no. 4, pp. 462–72, May 2010.
- [218] E. Doménech *et al.*, “AMPK and PFKFB3 mediate glycolysis and survival in response to mitophagy during mitotic arrest,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 17, no. 10, pp. 1304–1316, 2015.
- [219] H. T. Kang and E. S. Hwang, “Nicotinamide enhances mitochondria quality through autophagy activation in human cells,” *Aging Cell*, vol. 8, no. 4, pp. 426–438, 2009.
- [220] M. Mauro-Lizcano *et al.*, “New method to assess mitophagy flux by flow cytometry,” *Autophagy*, vol. 11, no. 5, pp. 833–843, 2015.
- [221] S. Rodriguez-Enriquez, I. Kim, R. T. Currin, and J. J. Lemasters, “Tracker dyes to probe mitochondrial autophagy (mitophagy) in rat hepatocytes.,” *Autophagy*, vol. 2, no. 1, pp. 39–46, 2008.

- [222] G. Chidlow, J. P. M. Wood, P. I. Sia, and R. J. Casson, "Distribution and activity of mitochondrial proteins in vascular and avascular retinas: Implications for retinal metabolism," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 60, no. 1, pp. 331–344, 2019.
- [223] T. G. McWilliams, A. R. Prescott, B. Villarejo-Zori, G. Ball, P. Boya, and I. G. Ganley, "A comparative map of macroautophagy and mitophagy in the vertebrate eye.," *Autophagy*, vol. 15, no. 7, pp. 1296–1308, Jul. 2019.
- [224] S. K. Swamynathan, "Ocular surface development and gene expression," *J. Ophthalmol.*, vol. 2013, 2013.
- [225] E. Prokofyeva, A. Wegener, and E. Zrenner, "Cataract prevalence and prevention in Europe: A literature review," *Acta Ophthalmol.*, vol. 91, no. 5, pp. 395–405, 2013.
- [226] N. A. Delamere, "Ciliary Body and Ciliary Epithelium.," *Adv. Organ Biol.*, vol. 10, pp. 127–148, Jan. 2005.
- [227] M. Barot, M. R. Gokulgandhi, and A. K. Mitra, "Mitochondrial dysfunction in retinal diseases," *Curr. Eye Res.*, vol. 36, no. 12, pp. 1069–1077, 2011.
- [228] C. Giordano *et al.*, "Efficient mitochondrial biogenesis drives incomplete penetrance in Leber's hereditary optic neuropathy," *Brain*, vol. 137, no. 2, pp. 335–353, 2014.
- [229] M. T. T. Wong-Riley, "Energy metabolism of the visual system.," *Eye Brain*, vol. 2, pp. 99–116, 2010.
- [230] L. D. Carter-Dawson and M. M. Lavail, "Rods and cones in the mouse retina. I. Structural analysis using light and electron microscopy," *J. Comp. Neurol.*, vol. 188, no. 2, pp. 245–262, 1979.
- [231] T. G. McWilliams and M. M. Muqit, "PINK1 and Parkin: emerging themes in mitochondrial homeostasis," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 45, pp. 83–91, 2017.
- [232] C. H. O. Davis *et al.*, "Transcellular degradation of axonal mitochondria," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 26, pp. 9633–9638, 2014.
- [233] Y. R. Juste and A. M. Cuervo, "Analysis of Chaperone-Mediated Autophagy.," *Methods Mol. Biol.*, vol. 1880, no. 05, pp. 703–727, 2019.
- [234] S. Lee, Y. Sato, and R. A. Nixon, "Lysosomal proteolysis inhibition selectively disrupts axonal transport of degradative organelles and causes an Alzheimer's-like axonal dystrophy," *J. Neurosci.*, vol. 31, no. 21, pp. 7817–7830, 2011.
- [235] E. Vecino, F. D. Rodriguez, N. Ruzafa, X. Pereiro, and S. C. Sharma, "Glia-neuron interactions in the mammalian retina," *Prog. Retin. Eye Res.*, vol. 51, pp. 1–40, 2016.
- [236] R. Barhoum *et al.*, "Functional and structural modifications during retinal degeneration in the rd10 mouse," *Neuroscience*, vol. 155, no. 3, pp. 698–713, 2008.
- [237] T. Nakazawa *et al.*, "Attenuated glial reactions and photoreceptor degeneration after retinal detachment in mice deficient in glial fibrillary acidic protein and vimentin.," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 48, no. 6, pp. 2760–8, Jun. 2007.

- [238] S. M. Ferguson, "Axonal transport and maturation of lysosomes.," *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 51, no. 5, pp. 45–51, 2018.
- [239] S. Finkbeiner, "The Autophagy Lysosomal Pathway and Neurodegeneration," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 1, p. a033993, 2019.
- [240] S. H. Barondes *et al.*, "Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins.," *Cell*, vol. 76, no. 4, pp. 597–8, Feb. 1994.
- [241] J. R. Hong *et al.*, "Phosphatidylserine receptor is required for the engulfment of dead apoptotic cells and for normal embryonic development in zebrafish," *Development*, vol. 131, no. 21, pp. 5417–5427, 2004.
- [242] J. M. Gohlke, W. C. Griffith, and E. M. Faustman, "The role of cell death during neocortical neurogenesis and synaptogenesis: Implications from a computational model for the rat and mouse," *Dev. Brain Res.*, vol. 151, no. 1–2, pp. 43–54, 2004.
- [243] M. A. Mellen, E. J. de la Rosa, and P. Boya, "The autophagic machinery is necessary for removal of cell corpses from the developing retinal neuroepithelium.," *Cell Death Differ.*, vol. 15, no. 8, pp. 1279–1290, Aug. 2008.
- [244] B. Diaz, B. Pimentel, F. de Pablo, and E. J. de La Rosa, "Apoptotic cell death of proliferating neuroepithelial cells in the embryonic retina is prevented by insulin.," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 11, no. 5, pp. 1624–1632, May 1999.
- [245] J. J. Lum *et al.*, "Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis.," *Cell*, vol. 120, no. 2, pp. 237–248, Jan. 2005.
- [246] N. Mizushima and D. J. Klionsky, "Protein turnover via autophagy: implications for metabolism.," *Annu. Rev. Nutr.*, vol. 27, pp. 19–40, 2007.
- [247] R. Singh and A. M. Cuervo, "Autophagy in the cellular energetic balance.," *Cell Metab.*, vol. 13, no. 5, pp. 495–504, May 2011.
- [248] J. F. Keij, C. Bell-Prince, and J. A. Steinkamp, "Staining of mitochondrial membranes with 10-nonyl acridine orange, MitoFluor Green, and MitoTracker Green is affected by mitochondrial membrane potential altering drugs.," *Cytometry*, vol. 39, no. 3, pp. 203–210, Mar. 2000.
- [249] M. Poot *et al.*, "Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains," *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 44, no. 12, pp. 1363–1372, 1996.
- [250] S. Svenning and T. Johansen, "Selective autophagy," *Essays Biochem.*, vol. 55, no. 1, pp. 79–92, 2013.
- [251] N. Matsuda *et al.*, "PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy," *J. Cell Biol.*, vol. 189, no. 2, pp. 211–221, 2010.
- [252] M. Tagaya and K. Arasaki, "Regulation of Mitochondrial Dynamics and Autophagy by the Mitochondria-Associated Membrane.," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 997, pp. 33–47, 2017.

- [253] E. P. Bulthuis, M. J. W. Adjobo-Hermans, P. H. G. M. Willems, and W. J. H. Koopman, "Mitochondrial Morphofunction in Mammalian Cells.," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 30, no. 18, pp. 2066–2109, Jun. 2019.
- [254] M. Safran and W. G. J. Kaelin, "HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway.," *J. Clin. Invest.*, vol. 111, no. 6, pp. 779–783, Mar. 2003.
- [255] M. P. Horowitz and J. T. Greenamyre, "Mitochondrial iron metabolism and its role in neurodegeneration.," *J. Alzheimers. Dis.*, vol. 20 Suppl 2, pp. S551-68, 2010.
- [256] H. Zhang *et al.*, "Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1alpha synthesis and block tumor growth.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 50, pp. 19579–19586, Dec. 2008.
- [257] S. Rikka *et al.*, "Bnip3 impairs mitochondrial bioenergetics and stimulates mitochondrial turnover.," *Cell Death Differ.*, vol. 18, no. 4, pp. 721–731, Apr. 2011.
- [258] R. A. Hanna, M. N. Quinsay, A. M. Orogo, K. Giang, S. Rikka, and A. B. Gustafsson, "Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) interacts with Bnip3 protein to selectively remove endoplasmic reticulum and mitochondria via autophagy.," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 23, pp. 19094–19104, Jun. 2012.
- [259] K. N. Leibovic, J. E. Dowling, and Y. Y. Kim, "Background and bleaching equivalence in steady-state adaptation of vertebrate rods.," *J. Neurosci.*, vol. 7, no. 4, pp. 1056–1063, Apr. 1987.
- [260] J. B. Ames, J. Raap, J. Lugtenburg, and R. A. Mathies, "Resonance Raman study of halorhodopsin photocycle kinetics, chromophore structure, and chloride-pumping mechanism.," *Biochemistry*, vol. 31, no. 50, pp. 12546–12554, Dec. 1992.
- [261] W. Hemmer, I. Riesinger, T. Wallimann, H. M. Eppenberger, and A. F. Quest, "Brain-type creatine kinase in photoreceptor cell outer segments: role of a phosphocreatine circuit in outer segment energy metabolism and phototransduction.," *J. Cell Sci.*, vol. 106 ( Pt 2, pp. 671–683, Oct. 1993.
- [262] Z. Zhou, T. A. Doggett, A. Sene, R. S. Apte, and T. A. Ferguson, "Autophagy supports survival and phototransduction protein levels in rod photoreceptors.," *Cell Death Differ.*, vol. 22, no. 3, pp. 488–498, Mar. 2015.
- [263] H. Kolb and D. Marshak, "The midget pathways of the primate retina.," *Doc. Ophthalmol.*, vol. 106, no. 1, pp. 67–81, Jan. 2003.
- [264] A. Reichenbach and A. Bringmann, *Müller cells in the healthy and diseased retina*. 2010.
- [265] A. Reichenbach and A. Bringmann, "New functions of Muller cells.," *Glia*, vol. 61, no. 5, pp. 651–678, May 2013.
- [266] D. M. Skytt *et al.*, "Glia-Neuron Interactions in the Retina Can Be Studied in Cocultures of Müller Cells and Retinal Ganglion Cells," *Biomed Res. Int.*, vol. 2016, 2016.
- [267] A. K. Toft-Kehler *et al.*, "Mitochondrial function in Müller cells - Does it matter?,"

- Mitochondrion*, vol. 36, pp. 43–51, 2017.
- [268] E. Perlson, S. Maday, M.-M. Fu, A. J. Moughamian, and E. L. F. Holzbaur, “Retrograde axonal transport: pathways to cell death?,” *Trends Neurosci.*, vol. 33, no. 7, pp. 335–344, Jul. 2010.
  - [269] S. Maday, K. E. Wallace, and E. L. F. Holzbaur, “Autophagosomes initiate distally and mature during transport toward the cell soma in primary neurons.,” *J. Cell Biol.*, vol. 196, no. 4, pp. 407–417, Feb. 2012.
  - [270] S. Kimura, T. Noda, and T. Yoshimori, “Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3.,” *Autophagy*, vol. 3, no. 5, pp. 452–460, 2007.
  - [271] F. L. Lin *et al.*, “The natural retinoprotectant chrysophanol attenuated photoreceptor cell apoptosis in an N-methyl-N-nitrosourea-induced mouse model of retinal degeneration,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. January, pp. 1–13, 2017.
  - [272] W. M. Yan *et al.*, “The reason for the amelioration of N-methyl-N-nitrosourea-induced retinitis pigmentosa in rats by hydrogen-rich saline,” *Int. J. Ophthalmol.*, vol. 10, no. 10, pp. 1495–1503, 2017.
  - [273] C. Gargini, E. Terzibasi, F. Mazzoni, and E. Strettoi, “Retinal organization in the retinal degeneration 10 (rd10) mutant mouse: a morphological and ERG study.,” *J. Comp. Neurol.*, vol. 500, no. 2, pp. 222–238, Jan. 2007.
  - [274] A. Lundkvist, A. Reichenbach, C. Betsholtz, P. Carmeliet, H. Wolburg, and M. Pekny, “Under stress, the absence of intermediate filaments from Muller cells in the retina has structural and functional consequences.,” *J. Cell Sci.*, vol. 117, no. Pt 16, pp. 3481–3488, Jul. 2004.
  - [275] K. Eastlake, P. J. Banerjee, A. Angbohang, D. G. Charteris, P. T. Khaw, and G. A. Limb, “Muller glia as an important source of cytokines and inflammatory factors present in the gliotic retina during proliferative vitreoretinopathy.,” *Glia*, vol. 64, no. 4, pp. 495–506, Apr. 2016.
  - [276] J.-S. Wang and V. J. Kefalov, “The cone-specific visual cycle.,” *Prog. Retin. Eye Res.*, vol. 30, no. 2, pp. 115–128, Mar. 2011.
  - [277] H.-C. Lee and Y.-H. Wei, “Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress.,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 37, no. 4, pp. 822–834, Apr. 2005.
  - [278] G. Twig and O. S. Shirihai, “The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy.,” *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 14, no. 10, pp. 1939–1951, May 2011.
  - [279] F. Y. Wan, Y. N. Wang, and G. J. Zhang, “The influence of oxidation of membrane thiol groups on lysosomal proton permeability.,” *Biochem. J.*, vol. 360, no. Pt 2, pp. 355–362, Dec. 2001.
  - [280] Y. Wu and L. Tang, “Bcl-2 Family Proteins Regulate Apoptosis and Epithelial to Mesenchymal Transition by Calcium Signals.,” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 22, no. 30, pp. 4700–4704, 2016.



- [281] R. Iurlaro and C. Munoz-Pinedo, “Cell death induced by endoplasmic reticulum stress.,” *FEBS J.*, vol. 283, no. 14, pp. 2640–2652, Jul. 2016.
- [282] C. Hetz, E. Chevet, and S. A. Oakes, “Proteostasis control by the unfolded protein response.,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 17, no. 7, pp. 829–838, Jul. 2015.
- [283] Y. Pesah *et al.*, “Drosophila parkin mutants have decreased mass and cell size and increased sensitivity to oxygen radical stress.,” *Development*, vol. 131, no. 9, pp. 2183–2194, May 2004.
- [284] J. C. Greene, A. J. Whitworth, L. A. Andrews, T. J. Parker, and L. J. Pallanck, “Genetic and genomic studies of Drosophila parkin mutants implicate oxidative stress and innate immune responses in pathogenesis.,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 14, no. 6, pp. 799–811, Mar. 2005.
- [285] R. Trollmann, M. Richter, S. Jung, G. Walkinshaw, and F. Brackmann, “Pharmacologic stabilization of hypoxia-inducible transcription factors protects developing mouse brain from hypoxia-induced apoptotic cell death.,” *Neuroscience*, vol. 278, pp. 327–342, Oct. 2014.
- [286] N. M. Mazure and J. Pouyssegur, “Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival?,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 22, no. 2, pp. 177–180, Apr. 2010.
- [287] H. Liu, H. Zhu, T. Li, P. Zhang, N. Wang, and X. Sun, “Prolyl-4-Hydroxylases Inhibitor Stabilizes HIF-1 $\alpha$  and Increases Mitophagy to Reduce Cell Death After Experimental Retinal Detachment.,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 57, no. 4, pp. 1807–1815, Apr. 2016.
- [288] A. Sierra, O. Abiega, A. Shahraz, and H. Neumann, “Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis.,” *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 7, p. 6, 2013.
- [289] R. M. Ransohoff, “How neuroinflammation contributes to neurodegeneration.,” *Science*, vol. 353, no. 6301, pp. 777–783, Aug. 2016.
- [290] A. Nimmerjahn, F. Kirchhoff, and F. Helmchen, “Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo.,” *Science*, vol. 308, no. 5726, pp. 1314–1318, May 2005.
- [291] U.-K. Hanisch and H. Kettenmann, “Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain.,” *Nat. Neurosci.*, vol. 10, no. 11, pp. 1387–1394, Nov. 2007.
- [292] G. C. Brown and J. J. Neher, “Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons.,” *Mol. Neurobiol.*, vol. 41, no. 2–3, pp. 242–247, Jun. 2010.
- [293] M. Domercq, N. Vazquez-Villoldo, and C. Matute, “Neurotransmitter signaling in the pathophysiology of microglia.,” *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 7, p. 49, 2013.
- [294] P. Boya and G. Kroemer, “Lysosomal membrane permeabilization in cell death.,” *Oncogene*, vol. 27, no. 50, pp. 6434–6451, Oct. 2008.

- [295] K. A. Clayton, A. A. Van Enoo, and T. Ikezu, “Alzheimer’s Disease: The Role of Microglia in Brain Homeostasis and Proteopathy,” *Front. Neurosci.*, vol. 11, p. 680, 2017.
- [296] S.-W. Wong, P. Sil, and J. Martinez, “Rubicon: LC3-associated phagocytosis and beyond,” *FEBS J.*, vol. 285, no. 8, pp. 1379–1388, Apr. 2018.



Durante esta Tesis Doctoral, se han obtenido las siguientes publicaciones:

1. *Autophagy in the eye: Development, degeneration, and aging*. Boya, P., Esteban-Martínez, L., Serrano-Puebla, A., Gómez-Sintes R., **Villarejo-Zori, B.** Prog Retin Eye Res. 2016 Nov;55:206-245.
2. *Cytofluorometric Assessment of Mitophagic Flux in Mammalian Cells and Tissues*. Esteban-Martinez, L.\*, **Villarejo-Zori, B.\***, Boya, P. Methods Enzymol. 2017;588:209-217.
3. *Autophagy and vision*. **Villarejo-Zori, B.**, Boya, P. Med Sci (Paris). 2017 Mar;33(3):297-304.
4. *Standard Assays for the Study of Autophagy in the Ex Vivo Retina*. Gómez-Sintes, R., **Villarejo-Zori, B.**, Serrano-Puebla, A., Esteban-Martínez, L., Sierra-Filardi, E., Ramírez-Pardo, I., Rodríguez-Muela, N., Boya, P. Cells. 2017 Oct 22;6(4).
5. A comparative map of macroautophagy and mitophagy in the vertebrate eye. McWilliams, T.G., Prescott, A.R., **Villarejo-Zori, B.**, Ball, G., Boya, P., Ganley IG.



